UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT WETENSCHAPPEN

Opzuivering en karakterisatie van antibacteriële componenten tegen *Clostridium difficile*

Marilyn DE GRAEVE

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de Biochemie en de Biotechnologie
Major Microbiële Biotechnologie
Academiejaar 2013-2014

Promotor: prof. dr. ir. Filip Van Immerseel
Wetenschappelijk begeleider: drs. Sofie Geeraerts
Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten
Faculteit Diergeneeskunde

THE FACULTY HAS BEEN APPROVED BY THE EAEVE

DANKWOORD

Allereerst wil ik professor Filip Van Immerseel bedanken voor de kans om mijn thesis in een super hechte vakgroep te mogen uitvoeren. Daarbij hoort een speciale vermelding voor alle mensen die deze groep zo bijzonder maken: Celine De Maesschalck, Dorien Mot, Evy Goossens, Iris Van Dosselaer, Karen Vermeulen, Karolien Van Driessche, Leen Timbermont, Lonneke Onrust, Marjan Steppe, Ruth Raspoet, Sergio Fernandes Da Costa, Sofie Kilroy, Stefanie Verherstraeten, Venessa Eeckhaut, Wolfgang De Cort en Sofie Geeraerts als kers op de taart.

Sofie G., merci om mij opnieuw uitstekend te begeleiden, zowel over thesis als over niet-thesis gerelateerde zaken. Bedankt voor de uitgebreide feedback en voor het verwijderen van neologismen zoals “zijeffecten”, “muisblindedarmmucus” en “spoorvormingssnelheid”. Zonder Sofie G. was mijn thesis niet zoals ze nu is, een afgewerkt geheel.

Naast de mensen op de vakgroep van professor Filip Van Immerseel wil ik tevens iedereen uit het labo bedanken voor de praktische hulp en goede sfeer.

Aan het beste lezersteam ooit, proficiat! Zonder Anja Van den Bussche, Charlotte Bollaert, Gert Elpers, Gino Van Moer, Margaux Boeraeve en Roel Claessens zou mijn thesis vol staan met onlogische zinsstructuren, foute voorzetsels, dt-fouten, enzoverder. Aan alle niet-lezers van het beste lezersteam ooit, ook proficiat! Jullie allen boden me doorheen dit project een mentale steun die niet te omschrijven valt. Aan mijn medethesisstudentjes Anya Van Raemdonck, Céline Mens, Delphi Van Haver, Els Timmerman en Sara Vleminckx wil ik zeggen: we made it! Annelies Torfs, Thomas Eekhout en Tom Raes, hoe vaak mocht ik jullie niet bestoken met allerhande vragen; bedankt daarvoor. Moge er nog vele restodates en andere feestjes volgen in de toekomst.

Fiets, we hebben samen heel wat *ups-and-downs*, bijna-doodervaringen en hobbelige wegen doorstaan; dank je wel om me overal naartoe te brengen.

Dries, ik zie je graag.

Om af te sluiten een graag woordje aan mijn familie. Bedankt voor de onvoorwaardelijke steun, en daarmee bedoel ik niet enkel de financiële steun die me toeliet om te kunnen studeren. Mémé, dank u voor de heerlijkste overvloedige maaltijden ‘s zondags. Tante Agnes, merci dat ik altijd op jou kon rekenen voor een warme slaapplaats. Jelle, ook al ben je stiekem geen familie, bij jou voel ik me thuis. Ouders, jullie zijn gewoon de beste!

INHOUDSOPGAVE

DANKWOORD ..... **III**

INHOUDSOPGAVE ..... **IV**

LIJST VAN FIGUREN ..... **VII**

LIJST VAN TABELLEN ..... **VIII**

LIJST MET AFKORTINGEN ..... **IX**

SAMENVATTING ..... **XI**

SUMMARY ..... **XII**

1. INLEIDING **1**

1.1 *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*: DE KIEM **1**

1.1.1 ALGEMENE KENMERKEN 1

1.1.2 TAXONOMIE 2

1.1.3 VOORKOMEN 2

1.2 *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INFECTIES **3**

1.2.1 DEFINITIE 3

1.2.2 SYMPTOMEN 3

1.2.3 PREDISPONERENDE FACTOREN 3

1.2.4 TRANSMISSIE 4

1.2.5 PATHOGENESE 5

1.2.6 ANDERE VIRULENTIEFACTOREN 9

1.2.7 EPIDEMIOLOGIE 11

1.2.8 DIAGNOSE 13

1.2.9 PREVENTIE 14

1.2.10 BEHANDELING 15

2. DOELSTELLING **20**

2.1 WORKFLOW **20**

3. RESULTATEN **22**

BIJDRAGE VAN DERDEN **22**

3.1 KARAKTERISATIE AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS* **22**

3.1.1 MAXIMALE PRODUCTIE AMC 22

3.1.2 INVLOED VAN PH 23

3.1.3 INVLOED VAN TEMPERATUUR 24

3.1.4 INVLOED VAN PROTEASEN 25

3.1.5 EFFECT VAN BA SN OP DARMCELLEN *IN VITRO* 27

3.2 OPZUIVERING AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS* **28**

3.2.1 *SOLID PHASE EXTRACTION* CHROMATOGRAFIE 28

3.2.2 *HIGH PRESSURE LIQUID* CHROMATOGRAFIE 28

3.2.3 HPLC-ESI MASSASPECTROMETRIE 29

3.3 SELECTIVITEIT AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS* **33**

3.4 ANTIBACTERIËLE ACTIVITEIT VAN *C. PERFRINGENS* **36**

3.4.1 Optimalisatie 36
3.4.2 Opzuivering AMC van CP SN 37
3.5 BEPALING VAN TOXINEGENEN VAN *C. DIFFICILE* STAMMEN 38
3.5.1 Optimalisatie van PCR 38
3.5.2 Aanwezigheid van toxine A en toxine B genen 38
3.5.3 Aanwezigheid van binaire toxinegenen 40
4. DISCUSSIE 42
4.1 KARAKTERISATIE AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS* 42
4.1.1 Maximale productie AMC 42
4.1.2 Invloed van pH, temperatuur en proteasen 42
4.1.3 Effect van BA SN op darmcellen *IN VITRO* 42
4.2 OPZUIVERING AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS* 43
4.3 SELECTIVITEIT AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS* 43
4.4 ANTIBACTERIËLE ACTIVITEIT VAN *C. PERFRINGENS* 44
4.4.1 Optimalisatie 44
4.4.2 Opzuivering AMC van CP SN 44
4.5 BEPALING VAN TOXINEGENEN VAN *C. DIFFICILE* STAMMEN 44
4.5.1 Optimalisatie van PCR 44
4.5.2 Aanwezigheid van toxine A en toxine B genen 45
4.5.3 Aanwezigheid van binaire toxinegenen 45
4.6 CONCLUSIE 45
5. MATERIAAL EN METHODEN 46
5.1 KARAKTERISATIE AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS* 46
5.1.1 Maximale productie AMC 46
5.1.2 Invloed van pH 46
5.1.3 Invloed van temperatuur 46
5.1.4 Invloed van proteasen 46
5.1.5 Effect van BA SN op darmcellen *IN VITRO* 47
5.2 OPZUIVERING AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS* 47
5.2.1 Zuurprecipitatie BA SN 47
5.2.2 *Solid phase extraction* chromatografie 48
5.2.3 *High pressure liquid* chromatografie 48
5.2.4 HPLC-ESI massaspectrometrie 48
5.3 SELECTIVITEIT AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS* 48
5.4 ANTIBACTERIËLE ACTIVITEIT VAN *C. PERFRINGENS* 49
5.4.1 Optimalisatie 49
5.4.2 Opzuivering AMC van CP SN 49
5.5 BEPALING VAN TOXINEGENEN VAN *C. DIFFICILE* STAMMEN 50
5.5.1 Optimalisatie van PCR 50
5.5.2 Aanwezigheid van toxine A en toxine B genen 51
5.5.3 Aanwezigheid van binaire toxinegenen 51
6. REFERENTIES 53

7. ADDENDUM **66**

7.1 BACTERIËLE MEDIA **66**

7.2 PROTOCOLS **67**

7.3 RESULTATEN **68**

LIJST VAN FIGUREN

Figuur 1.1 *C. difficile* bacterie. 1

Figuur 1.2 Darmbiopt van patiënt geïdentificeerd met pseudomembraan colitis. 3

Figuur 1.3 Pathogenese van CDI. 5

Figuur 1.4 Structuur van TcdA en TcdB. 6

Figuur 1.5 Mechanisme van cellulaire intoxicatie door TcdA en TcdB. 7

Figuur 1.6 Inhibitie van de GTPase cyclus door TcdA en TcdB. 8

Figuur 1.7 *C. difficile* kiem en voorspore. 10

Figuur 2.1 Overzicht van de workflow. 21

Figuur 3.1 Resultaat van agar well test met BA SN. 22

Figuur 3.2 BA groeicurve en antibacteriële activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans. 23

Figuur 3.3 Invloed van pH op de activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans. 24

Figuur 3.4 Invloed van temperatuur op de activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans. 25

Figuur 3.5 Invloed van proteasen op de activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans. 26

Figuur 3.6 Invloed van proteasen op albumine. 26

Figuur 3.7 Effect van *B. amyloliquefaciens* supernatans op darmcellen *in vitro*. 27

Figuur 3.8 Chromatogram na HPLC opzuivering. 28

Figuur 3.9 Chromatogram van het niet-opgezuiverd actief staal. 29

Figuur 3.10 Massaspectra en chromatogrammen van surfactine. 30

Figuur 3.11 Massaspectra en chromatogrammen van bacillomycine. 31

Figuur 3.12 Massaspectra en chromatogrammen van fengycine. 32

Figuur 3.13 Chromatogram van het opgezuiverd actief staal. 32

Figuur 3.14 Activiteit van BA SN en ZP tegen verschillende genera. 35

Figuur 3.15 Activiteit van BA SN en ZP tegen Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën. 35

Figuur 3.16 Gelelektroforese van multiplex PCR met tcdA, tcdB en tpi primers. 39

Figuur 3.17 Gelelektroforese van multiplex PCR met cdtA en cdtB primers. 40

Figuur 7.1 MS spectra van aangekocht surfactine. 71

Figuur 7.2 MS spectra van het opgezuiverd actief staal. 72

Figuur 7.3 Optimalisatie PCR van toxine A en toxine B. 75

Figuur 7.4 Aanwezigheid van toxine A en toxine B genen. 76

Figuur 7.5 Aanwezigheid van binaire toxinegenen. 77

Figuur 7.6 Opstelling NRU assay. 78

Figuur 7.7 Positie van voorwaartse en achterwaartse tcdA primers laten een differentiatie toe tussen A^+B^+ en A^-B^+ stammen. 78

LIJST VAN TABELLEN

Tabel 3.1 Lijst van bacteriële isolaten en hun gevoeligheid aan *B. amyloliquefaciens* supernatans. 33

Tabel 3.2 Antibacteriële activiteit en groei van CP38 in verschillende media. 36

Tabel 3.3 Overzicht van *C. difficile* ribotypes en aanwezige toxinegenen. 41

Table 5.1 *Clostridium difficile* primers. 51

Tabel 7.1 Rauwe data: karakterisatie AMC van *B. amyloliquefaciens.* 68

Tabel 7.2 Rauwe data: opzuivering AMC van *B. amyloliquefaciens.* 70

Tabel 7.3 Rauwe data: selectiviteit AMC van *B. amyloliquefaciens.* 73

Tabel 7.4 Rauwe data: antibacteriële activiteit van *C. perfringens.* 74

LIJST MET AFKORTINGEN

16S rDNA	16S ribosomaal DNA
ACN	Acetonitril
AD	Gedestilleerd water
ADP	Adenosinedifosfaat
AFLP	Geamplificeerd fragment lengtepolymorfisme
AMC	Antimicrobiële component
ATP	Adenosinetrifosfaat
AU	*Activity unit*
BA	*B. amyloliquefaciens*
BHI	*Brain Heart* medium
Bp	Basenparen
Caco-2	Humane epitheliale colorectale adenocarcinoomcellijn
CD	*C. difficile*
CDA	*Clostridium difficile* agar
CDAD	*C. difficile associated disease*
CDB	*Clostridium difficile* medium
CDC	*Centre for Disease Control and prevention*
CDI	*C. difficile* infectie
CDT	Binair toxine
CdtA	Enzymatische eenheid van het binair toxine
cdtA	Binair toxinegen
cdtA F/R	*Forward* en *reverse* primers van *cdtA*
CdtB	Bindende eenheid van het binair toxine
cdtB	Binair toxinegen
cdtB F/R	*Forward* en *reverse* primers van *cdtB*
CDVPI	*C. difficile* typestam VPI
CFU	*Colony forming units*
CP	*C. perfringens*
CP38	*C. perfringens* stam 38
CPD	Cysteïne proteasedomein
CROP	*Clostridium* repetitieve oligopeptiden
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's* medium
ECDC	*European Centre for Disease Prevention and Control*
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
ELISA	*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*
EMA	*European Medicines Agency*
ESI	Elektrospray ionisatie
FAGG	Federaal Agentschap voor Geneesmiddelen en Gezondheidsproducten
FBS	Foetaal kalfsserum
FDA	*Food and Drug Administration*
FliC	Flagelline
FliD	*Flagellar hook-associated protein 2*
GAP	*GTPase-activating proteins*
GC	Guanine-cytosine
GDI	*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*
GEF	*Guanine nucleotide exchange factors*
GT	Glycosyltransferase
GTPase	Guanosine trifosfatase
$HBBS^{+/-}$	*Hank's Balanced Salt Solution*
HPLC	*High pressure liquid* chromatografie
HR	Hydrofobe regio
IEC	*Ion exchange* chromatografie
IgG	Immunoglobuline G
LCT	*Large clostridial cytotoxins*
LTQ	*Linear ion trap quadrupole-Orbitrap*
MBL	*Massachusetts Biologic Laboratories*
MLST	Multi-locus sequentie typering
MLVA	*Multiple-Locus variable number tandem repeat analysis*
MOLP	Medium geoptimaliseerd voor lipopeptideproductie
MRS	*de Man, Rogosa and Sharpe* medium
MRSA	*de Man, Rogosa and Sharpe* agar
MRSA	Methicillineresistente *Staphylococcus aureus*
MS	Massaspectrometrie
MS^2	Tandem massaspectrometrie
NEMA	Niet-essentiële aminozuren
NR	Neutraal rood oplossing
NRU	*Neutral red uptake*
OD	Optische densiteit
PCR	*Polymerase chain reaction*
PEG	Polyethyleenglycol
PFGE	*Pulsed-field* gelelektroforese
PMC	Pseudomembraan colitis
qPCR	Kwantitatieve *Polymerase chain reaction*
RCA	*Reinforced Clostridial* agar
RCM	*Reinforced Clostridial* Medium
RDB	Receptor bindend domein
REA	Restrictie endonuclease analyse
RPM	Rotaties per minuut
S-laag	*Surface-exposed proteinaceous layer*
SDS	Natriumdodecylsulfaat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfaat-polyacrylamidegelelektroforese

SEM	Scanning elektronenmicroscopie
SLP, SlpA	S-laag eiwit
SN	Supernatans
SPE	*Solid phase extraction* chromatografie
TEM	Transmissie elektronenmicroscopie
TcdA	Toxine A
tcdA	Toxine A gen
tcdA F/R	*Forward* en *reverse* primers van *tcdA*
TcdB	Toxine B
tcdB	Toxine B gen
tcdB F/R	*Forward* en *reverse* primers van *tcdB*
TcdC	*tcdA en tcdB* activator
tcdC	*tcdA en tcdB* regulerend gen
TcdD	*tcdA en tcdB* repressor
tcdD	*tcdA en tcdB* regulerend gen
TcdE	Holine-analoog
tcdE	*tcdA en tcdB* regulerend gen
TFA	Trifluorazijnzuur
TMD	Translocatie domein
Tpi	Triose fosfaat isomerase
tpi	Triose fosfaat isomerase gen
tpi F/R	*Forward* en *reverse* primers van *tpi*
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
TSB	Tryptone soya broth
UCL	*Université catholique de Louvain*
VRE	Vancomycineresistente enterococcen

SAMENVATTING

Clostridium difficile werd voor het eerst als een potentiële maagzuurbestendige, sporevormende pathogeen herkend in 1978. Nu wordt het gezien als een sterk opkomende antibioticaresistente pathogeen die ziektes kan veroorzaken in mensen en dieren. *C. difficile* infecties zijn het gevolg van een sterke bacteriële toxineproductie en zijn doorgaans, maar niet altijd geassocieerd met eerder gebruik van antibiotica. Breedspectrumantibiotica doden een hele range aan bacteriën af, wat leidt tot een verstoring van de normale darmflora. Hierdoor kan *C. difficile* overheersen in de darm en leiden tot verschillende aandoeningen zoals antibiotica geassocieerde diarree en pseudomembraan colitis.

In de laatste jaren werd er een wereldwijde toename in het aantal en de ernst van *C. difficile* infecties waargenomen. Daarnaast werd een verminderde efficiëntie van antibiotica tegen *C. difficile* opgemerkt. Gezien de grote kost die *C. difficile* met zich meebrengt, naar schatting 3 miljard euro in de Europese Unie per jaar, dient er naar een betere oplossing gezocht te worden voor de huidige antibioticabehandeling met metronidazol en vancomycine. Antimicrobiële componenten die een nauwspectrumactiviteit vertonen tegen *C. difficile* stammen en andere niet-pathogene darmbacteriën onaangetast laten, kunnen een oplossing bieden.

Voorafgaand onderzoek aan de vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten (Faculteit Diergeneeskunde, Ugent) toonde reeds aan dat een bepaalde *Bacillus amyloliquefaciens* en *Clostridium perfringens* duidelijke antimicrobiële activiteit tegen *C. difficile* bezitten. In dit project wordt getracht componenten verantwoordelijk voor deze antimicrobiële activiteit te karakteriseren, op te zuiveren en identificeren. Vervolgens wordt de selectiviteit van de componenten tegen andere niet-pathogene bacteriën van de darmflora nagegaan. De aanwezigheid van *C. difficile* toxinegenen, verantwoordelijk voor de virulentie van de kiem, wordt eveneens bestudeerd bij verschillende *C. difficile* stammen. Als blijkt dat deze componenten een sterke antimicrobiële activiteit vertonen tegen *C. difficile*, ze niet cytotoxisch zijn en weinig niet-pathogene darmbacteriën doden, kunnen ze mogelijks als behandeling voor *C. difficile* infecties gebruikt worden.

SUMMARY

Clostridium difficile was first recognized as a potential gastric acid resistant, spore producing pathogen in 1978. Now it is regarded as a rapidly emerging antibiotic resistant pathogen that causes disease in humans and animals. *C. difficile* infections are the result of a strong bacterial toxin production and are often associated with previous consumption of antibiotics. Broad-spectrum antibiotics kill a whole range of bacteria, which results in a disruption of the normal intestine flora. In this way, *C. difficile* can predominate in het intestine and hereby lead to different diseases like antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis.

In the last years, a worldwide increase in the number and the severity of *C. difficile* infections was observed. In addition, a reduced effectiveness of antibiotics against *C. difficile* was noted. Considering the huge costs for the management of *C. difficile* infections, estimated at 3 billion euro in the European Union each year, a better solution for the current antibiotic treatment with metronidazole and vancomycin should be looked for. Antimicrobial components that exhibit a narrow spectrum activity against *C. difficile* strains and leave other non-pathogenic intestinal bacteria intact, are a potential solution.

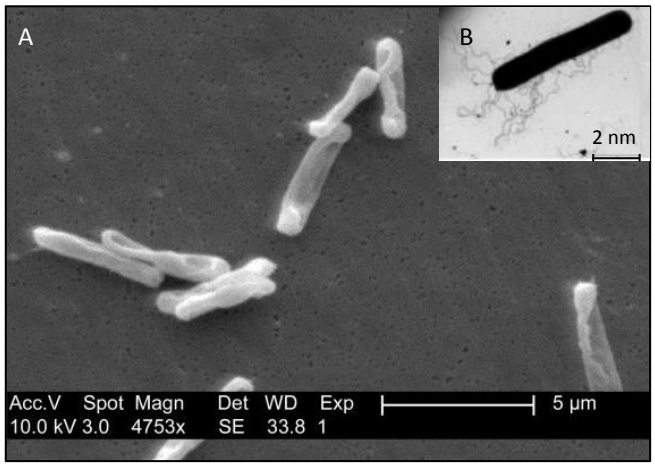
Prior studies at the department of Pathology, Bacteriology and Poultry Diseases (Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University), already demonstrated the production of antimicrobial components against *C. difficile* by a particular *Bacillus amyloliquefaciens* and *Clostridium perfringens*. This project aims to characterize, purify and identify the components responsible for this antimicrobial activity. Then, the selectivity of the components against other non-pathogenic bacteria of the intestinal microflora is examined. The presence of *C. difficile* toxin genes, responsible for the virulence of the strain, is also studied in different *C. difficile* strains. If these compounds exhibit a strong antimicrobial activity against *C. difficile*, are not cytotoxic and kill only few non-pathogenic intestinal bacteria, they can potentially be used for the treatment of *C. difficile* infections.

1. INLEIDING

1.1 *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*: DE KIEM

1.1.1 ALGEMENE KENMERKEN

Clostridium difficile is een strikt anaerobe, Gram-positieve, sporevormende, staafvormige bacterie (Figuur 1.1 A)(Paredes et al., 2005). Sommige *C. difficile* stammen zijn bewegelijk met behulp van peritrieche zweepharen (Figuur 1.1 B). Door de uniforme distributie van zweepharen op het celoppervlak kan de bacterie tuimelen en zich voortbewegen op een erg snelle en efficiënte manier (Tasteyre et al., 2000).



Figuur 1.1 *C. difficile* bacterie. A) Scanning elektronenmicroscopie (SEM) van *C. difficile* (Encyclopedie, 2014). **B)** Transmissie elektronenmicroscopie (TEM) van pathogene *C. difficile.* Figuur overgenomen uit Baban et al. (Baban et al., 2013).

C. difficile is heterotroof en haalt zijn energie, in de vorm van adenosinetrifosfaat (ATP), uit de anaerobe fermentatie van verschillend organisch materiaal. De bacterie is auxotroof voor vijf essentiële aminozuren namelijk leucine, isoleucine, proline, tryptofaan en valine. Toevoeging van een zesde aminozuur, met name glycine, versnelt de groei van *C. difficile* significant (Jackson et al., 2006). Doordat *C. difficile* de aerobe respiratie machinerie ontbreekt, kan deze strikt anaerobe bacterie slechts 24 u lang in aanwezigheid van zuurstof overleven in zijn vegatieve (bacteriële) vorm. Als spore kan *C. difficile* tot twee jaar overleven op dood materiaal in aanwezigheid van zuurstof (Kim et al., 1981).

Het genoom van *C. difficile* bestaat uit een circulair chromosoom van 4.290.252 basenparen (bp)(29,1% guanine-cytosine (GC) inhoud) en een circulair plasmide van 7.881 bp (27,9% GC inhoud). Elf procent van het genoom bestaat uit mobiele genetische elementen zoals conjugatieve transposons. Deze elementen bevatten genen verantwoordelijk voor antimicrobiële resistentie (o.a. tegen tetracycline en erythromycine), virulentie, gastheerinteractie en de productie van adhesiemoleculen. Door middel van horizontale gentransfer kan het bacterieel genoom zich aanpassen en zo inspelen op een veranderde omgeving (Brouwer et al., 2011, Brouwer et al., 2012; Sebaihia et al., 2006).

1.1.2 TAXONOMIE

De naam *Clostridium difficile* is afkomstig van het Griekse woord *kloster* (κλωστήρ) dat staaf betekent en verwijst naar de vorm van de bacterie; en het Latijnse woord *difficile* dat moeilijk betekent en verwijst naar de moeilijke isolatie van de kiem. De bacterie behoort tot het fylum van de Firmicutes, de klasse van de Clostridia, de orde van de Clostridiales en de familie van de Clostridiaceae.

Het genus *Clostridium* (*sensu lato*) omvat ongeveer 150 fylogenetische soorten met een verre onderliggende evolutionaire afstand die geen coherent taxon vormt. *Clostridium* species onderscheiden zich van *Bacillus* species door afwezigheid van een aerobe respiratie machinerie; en van *Mollicutes* species door aanwezigheid van peptidoglycaan in hun celwand. Met behulp van fylogenetische methoden gebaseerd op het 16S ribosomaal DNA (16S rDNA) werd het genus *Clostridium* onderverdeeld in 19 verschillende clusters (Stackebrandt et al., 1999). *C. difficile* behoort tot cluster XI. Deze cluster is taxonomisch zeer heterogeen en bevat tevens niet-sporevormers zoals *Peptostreptococcus anaerobius* en *Eubacterium tenue* (Collins et al., 1994). De nauwste verwanten van *C. difficile* zijn *C. sordellii*, dat (gas)gangreen in subcutane of submucosale weefsels en/of interne organen kan veroorzaken; en *C. bifermentans*, die wordt gezien als de niet pathogene verwant van *C. sordelii* (Mainil et al., 2006; Leja et al., 2013).

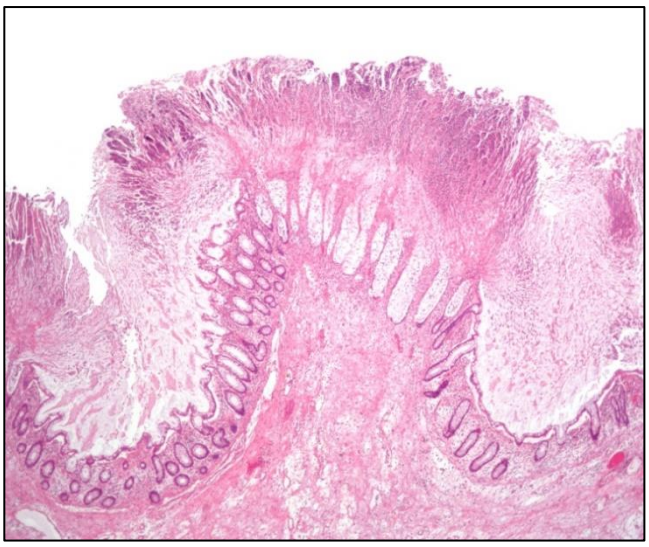
1.1.3 VOORKOMEN

Clostridium difficile, vroeger *Bacillus difficile* genaamd, werd voor het eerst geïdentificeerd in 1935 in de feces van pasgeborenen (Hall et al., 1935). In 1978 werd de naam aangepast naar *C. difficile* (Bartlett et al., 1978). De bacterie komt, in zijn vegatieve vorm of als spore, zowat overal in de natuur voor. In water, lucht, menselijke en dierlijke feces, op de meeste oppervlakten (zoals veelvuldig in ziekenhuizen) en in de bodem (Levett, 1986). De optimale groeitemperatuur bedraagt 37°C (mesofiel), wat de bacterie een ideale gast van de menselijke darmflora maakt.

1.2 *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INFECTIES

1.2.1 DEFINITIE

Een *C. difficile* infectie, of *Clostridium difficile* geassocieerde ziekte (*C. difficile associated disease*; CDAD), is de gemeenschappelijke naam voor alle aandoeningen die veroorzaakt worden door *Clostridium difficile*. Voorbeelden van *C. difficile* infecties (CDI's) zijn *C. difficile* geassocieerde diarree en pseudomembraan colitis (PMC), een ontsteking aan de dikke darm die dodelijk kan zijn (Figuur 1.2).



Figuur 1.2 Darmbiopt van patiënt geïdentificeerd met pseudomembraan colitis. Links is een microscopisch beeld van pseudomembraan colitis veroorzaakt door *C. difficile* weergegeven (lichtmicroscoop, haematoxyline-eosine kleuring). De lokale inflammatoire effecten van *C. difficile* infecties resulteren in de vorming van vulkaanachtige wonden. Het pseudomembraan bestaat uit dode intestinale cellen, leukocyten en mucus waarin overmatige groei van micro-organismen plaatsvindt (Encyclopedie, 2014).

1.2.2 SYMPTOMEN

In 1978 werd *C. difficile* geïdentificeerd als de oorzaak van pseudomembraan colitis in patiënten na behandeling met het breedspectrumantibioticum clindamycine (Bartlett et al., 1978). Hierna werden er meerdere symptomen gekoppeld aan de kolonisatie van *C. difficile*. Deze ziektesymptomen kunnen variëren van milde diarree tot een ernstige vorm van pseudomembraan colitis en toxisch megacolon met colon perforatie, peritonitis, en zelfs de dood tot gevolg (Brazier, 1998).

De meest voorkomende symptomen van CDI's zijn milde tot ernstige diarree. Bij ernstigere infecties krijgen patiënten zware diarree, buikpijn en kunnen ze last hebben van koorts, uitdroging, anorexia en een onbehagelijk of misselijk gevoel. Er kan tevens al een aanleiding naar pseudomembraan colitis optreden. In dat geval zijn de symptomen ernstiger (Kelly et al., 1994). De ziekte kan levensbedreigend worden als het darmweefsel sterk beschadigd wordt. Dan neemt de diarree af t.g.v. een verzwakte darmspierwerking en verwijdt de dikke darm (Sayedy et al., 2010). Deze aandoening staat gekend als toxisch megacolon (Kelly et al., 1994). Hoewel het toxisch megacolon slechts voorkomt bij 0,3 – 4% van patiënten met CDI is het erg fataal, met name bij 38 tot 80% van de patiënten met CDI (Sayedy et al., 2010).

1.2.3 PREDISPONERENDE FACTOREN

De drie belangrijkste predisponerende factoren voor CDI zijn antibioticumgebruik, ouderdom en hospitalisatie (Bartlett et al., 2008). Secundaire redenen voor het ontwikkelen van CDI's zijn een slechte voeding, vitamine D deficiëntie, de ziekte van Crohn, prikkelbare

darmaandoeningen, het gebruik van protonpompinhibitoren en immunosuppressieve medicatie zoals chemotherapie (Calfee, 2008; Cloud et al., 2007; Cunningham, 2006; Cunningham et al., 2003; Hopkins et al., 2002; Navaneethan et al., 2012; Raza et al., 2010; Simor et al., 2002; Youssef et al., 2012).

ANTIBIOTICUMGEBRUIK

De grootste risicofactor voor het ontwikkelen van CDI is het gebruik van antibiotica (Rupnik et al., 2009). Toediening van antibiotica leidt tot een verstoring van de normale microflora waardoor *C. difficile* de darm kan koloniseren. De enige reden waarom *C. difficile* de darmflora onder normale omstandigheden niet domineert, is door kolonisatieresistentie. Hierbij gaan andere darmbacteriën in competitie om voedingsstoffen en ruimte in de darm (Wilson, 1993; Wilson et al., 1985).

Er wordt gedacht dat 15 – 25% van alle antibioticum-gerelateerde diarree gekoppeld is aan *C. difficile* (Barbut et al., 2001). CDI's werden reeds geassocieerd met alle types antibiotica, maar sommige breedspectrumantibiotica geven een grotere kans op infectie waaronder clindamycine, cefalosporinen, penicillines, lincosamiden en, meer recent, fluoroquinolones (Cloud et al., 2007; Gaynes et al., 2004; Johnson et al., 1999; Kelly et al., 1994; Loo et al., 2005; Muto et al., 2005; Pepin et al., 2005).

OUDERDOM

Ouderdom is een van de belangrijkste risicofactoren voor het ontwikkelen van CDI's. Zo hebben personen met een leeftijd boven de 65 jaar vijfmaal meer kans om symptomatisch geïnfecteerd te worden door *C. difficile* (McDonald et al., 2006; Redelings et al., 2007). De verhoogde morbiditeit en mortaliteit bij ouderen is te wijten aan een afwezige of verminderde productie van immunoglobuline G (IgG) antilichamen tegen *C. difficile* toxines (Kyne et al., 2000; Kyne et al., 2001).

HOSPITALISATIE

Hoewel *C. difficile* overal kan voorkomen in de omgeving, is de kiem veelvuldig te vinden in zorginstellingen. Zo is de kans om gekoloniseerd te worden met *C. difficile* 10 – 25% hoger bij gehospitaliseerde patiënten en 4 – 20% hoger bij bewoners van rusthuizen (Bartlett, 1994; Simor et al., 2002). Hospitalisatie brengt verschillende predisponerende factoren samen zoals antibioticagebruik, de abundante aanwezigheid van sporen, een slechte handhygiëne van het personeel en een zwakker immuunsysteem bij ouderen (Rupnik et al., 2009). Tien procent van alle oudere patiënten (met een leeftijd boven 65 jaar oud) zijn gekoloniseerd met *C. difficile* bij opname. In de eerste week neemt 13-20% van de residentiële patiënten de kiem op in de darm. Na vier weken hospitalisatie loopt dit getal op tot 50% van de residentiële oudere patiënten (Brazier et al., 1999; McFarland et al., 1989; Viscidi et al., 1981).

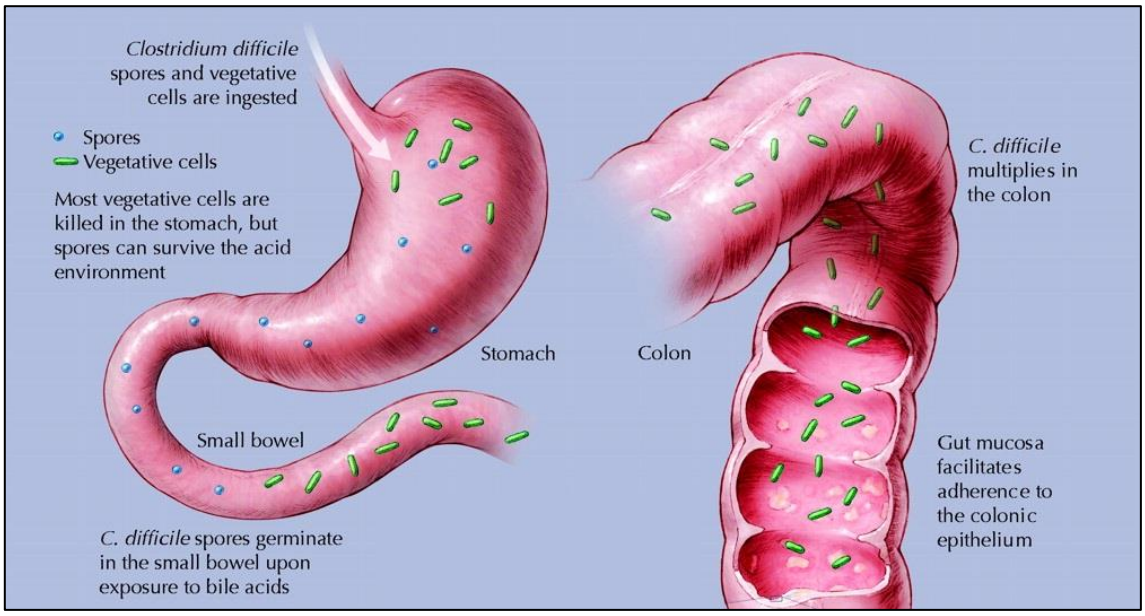
1.2.4 TRANSMISSIE

Het voorkomen van CDI's in zorginstellingen kan deels worden toegeschreven aan de productie van hardnekkige *C. difficile* sporen. De sporen zijn alom aanwezig, resistent aan veelgebruikte ontsmettingsmiddelen en antibiotica; en kunnen erg lange tijd overleven zonder verlies aan leefbaarheid (Lawley et al., 2010). Deze sporen zijn erg makkelijk overdraagbaar in onder andere ziekenhuizen, waarbij ze via het personeel worden

overgedragen tussen verschillende patiënten. Deze verschillende factoren maakt de sporen erg moeilijk te elimineren uit de omgeving (Gerding et al., 1995).

1.2.5 PATHOGENESE

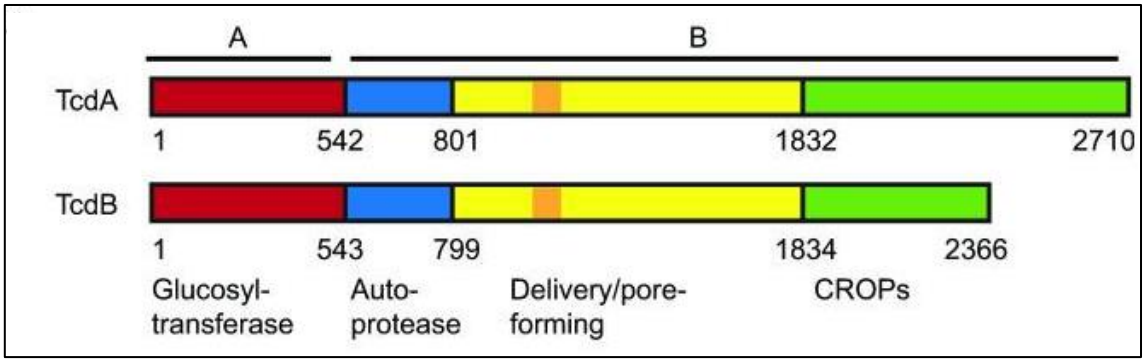
Terwijl 99% van de *C. difficile* vegatieve cellen in de maag gedood worden, zijn de sporen zuurbestendig en kunnen ze doorheen de maag passeren (Figuur 1.3). In de dunne darm ontkiemen de sporen onder invloed van galzuren (Figuur 1.3)(Wilson et al., 1985). Bij een verstoorde microflora kan *C. difficile* de darm koloniseren en virulentiefactoren zoals toxines produceren (Figuur 1.3)(Beaugerie et al., 2003; Dial et al., 2005; Poulain et al., 2006). Samengevat moeten er drie gebeurtenissen plaatsvinden: de normale microflora dient verstoord te zijn, *C. difficile* moet de darm succesvol kunnen koloniseren en vervolgens toxines produceren (Poulain et al., 2006). De drie gekende toxines van *C. difficile* zijn: toxine A, toxine B en het binaire toxine.


Clostridium difficile spores and vegetative cells are ingested
Spores
Vegetative cells
Most vegetative cells are killed in the stomach, but spores can survive the acid environment
Stomach
Small bowel
C. difficile spores germinate in the small bowel upon exposure to bile acids
Colon
C. difficile multiplies in the colon
Gut mucosa facilitates adherence to the colonic epithelium

Figuur 1.3 Pathogenese van CDI. Figuur overgenomen uit Poulain et al. (Poulain et al., 2006).

TCDA EN TCDB

Toxine A (TcdA; 308 kDa) en toxine B (TcdB; 269 kDa), behoren tot de grote *Clostridium* glycosyltransferase toxinefamilie (*large clostridial cytotoxins* (LCT)). Ze hebben een sterk geconserveerde aminozuursequentie en gelijkaardige structuur (von Eichel-Streiber et al., 1996). Andere gekende LCT's zijn de toxines TcsI en TcsH van *C. sordellii*, TcnA van *C. novyi* en Tcpl van *C. perfringens* types B en C (Amimoto et al., 2007; von Eichel-Streiber et al., 1996). Gezien de proximale locatie van *tcdA* t.o.v. *tcdB*, hoge sequentie homologie (66% gelijkenis) en gelijkaardige functie van beide toxines wordt gedacht dat de twee genen ontstaan zijn als het gevolg van een genduplicatie (von Eichel-Streiber et al., 1992). Beide eiwitten bevatten een N-terminaal gelegen glycosyltransferase (GT), een auto-katalytisch cysteïne proteasedomein (CPD), een centraal gelegen translocatie domein (TMD) met een hydrofobe regio (HR) en een C-terminaal gelegen receptor bindend domein (RBD) met *Clostridium* repetitieve oligopeptiden (CROP's)(Figuur 1.4)(Pruitt et al., 2012).



Figuur 1.4 Structuur van TcdA en TcdB. De toxines TcdA en TcdB bestaan uit vier domeinen; een N-terminaal gelegen glycosyltransferase domein (rood), een auto-katalytisch proteasedomein (blauw), een centraal gelegen translocatie domein (geel) met een hydrofobe regio (oranje box) en een C-terminaal gelegen receptor bindend domein (groen) met CROP's. De vier domeinen kunnen worden opgedeeld in twee functionele eenheden namelijk een enzymatische eenheid (deel A) en een eenheid die de aflevering van het glycosyltransferase medieert (deel B). Figuur overgenomen uit Pruitt et al. (Pruitt et al., 2012).

Het locus met TcdA en TcdB coderende genen wordt de pathogeniteits locus genoemd. Naast *tcdA* en *tcdB* omvat deze locus tevens twee regulerende genen, *tcdC* en *tcdD*; en een holine-analoog, *tcdE*. TcdD is een sigmafactor die de expressie van TcdA en TcdB positief reguleert, TcdC reguleert de toxine expressie negatief (Dupuy et al., 2008). TcdE is waarschijnlijk verantwoordelijk voor de vrijlating van TcdA en TcdB door het bacterieel membraan permeabel te maken (Tan et al., 2001). De expressie van de toxines wordt onderdrukt in de exponentiële groeifase van *C. difficile*. De toxinegenen ondervinden een katabole repressie waardoor de bacterie eerst gaat groeien. Pas in het begin van de stationaire groeifase wordt de expressie ervan significant opgedreven (Dupuy et al., 1998). Dit gaat gepaard met een stijging in expressie van TcdD; en een respectievelijke daling van TcdC expressie (Dupuy et al., 1998). De regulerende factoren voor de expressie van TcdD en TcdC zijn nog onbekend (Carter et al., 2007; Hundsberger et al., 1997).

De meeste klinische symptomen worden veroorzaakt door directe schade van het darmweefsel en een inflammatie gemedieerde respons ten gevolge van TcdA en TcdB (Jank et al., 2007). Beide toxines zijn cytotoxisch. Dit betekent dat ze d.m.v. afbraak van het actine cytoskelet en verstoring van de *tight junctions* de epitheliale weerstand van de darm verlagen, zo darmepitheelcellen vernietigen en zorgen voor vochtophoping (Alouf et al., 2006; Riegler et al., 1995; Thelestam et al., 2006).

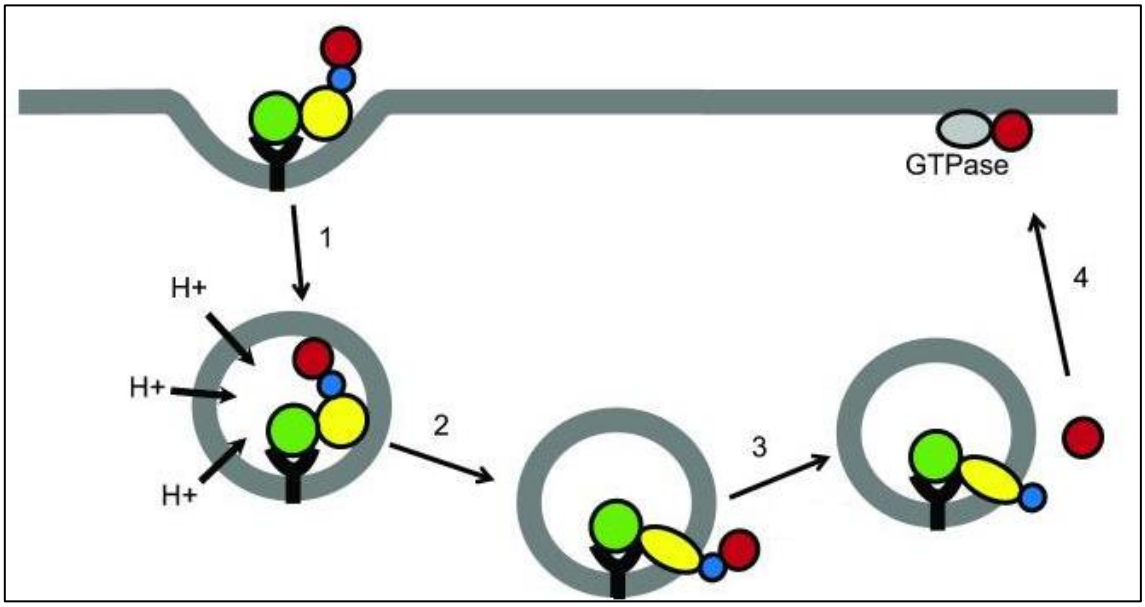
Oorspronkelijk werd gedacht dat TcdA het verantwoordelijke enterotoxine was voor CDI's en TcdB een synergistische rol speelde. Een studie toonde aan dat TcdA bloedingen, diarree en necrose van darmweefsel veroorzaakte terwijl TcdB dit niet kon. Enkel in aanwezigheid van een lage concentratie aan TcdA of bij mucosale beschadiging kon TcdB darmoedeem, longbloeding en dood in hamsters veroorzaken (Lyerly et al., 1985).

Sinds de jaren '90 zijn er enkele pathogene TcdA-negatieve en TcdB-positieve (A^-B^+) *C. difficile* stammen geïdentificeerd die sterfte bij hamsters kunnen veroorzaken (Alfa et al., 2000; Limaye et al., 2000; Lyras et al., 2009; Sambol et al., 2000). A^+B^- stammen bleken geen virulent effect op hamsters te hebben (Lyras et al., 2009). Daarnaast blijken alle klinische *C.*

difficile isolaten TcdB te produceren en is TcdB ongeveer 1000 maal potenter dan TcdA (Brito et al., 2002; Gerhard et al., 2008; Riegler et al., 1995; Shin et al., 2008). TcdB bevat tevens een pro-inflammatoire activiteit en kan darmepitheel en immuuncellen stimuleren om cytokines en chemokines te produceren (Kim et al., 2002; Ng et al., 2003; Savidge et al., 2003). Tot nu toe blijken alle *C. difficile* stammen die het TcdB ontbreken (A^-B^- en A^+B^-) avirulent te zijn in patiënten en dieren (Elliott et al., 2007; Kelly et al., 2008; Voth et al., 2005). Deze resultaten wijzen erop dat TcdA niet essentieel is voor de pathogenese van *C. difficile*.

De meeste pathogene *C. difficile* stammen zijn positief voor beide toxines (A^+B^+) en geven dezelfde symptomen als A^-B^+ stammen (Sambol et al., 2000). De ernst van de infectie neemt drastisch toe indien beide toxines systematisch worden toegediend (Hamm et al., 2006; Pavliakova et al., 2000). Systematische toxemie kan mogelijks leiden tot complicaties buiten de darm en wordt geassocieerd met ernstige vormen van CDI's (He et al., 2009; Steele et al., 2010).

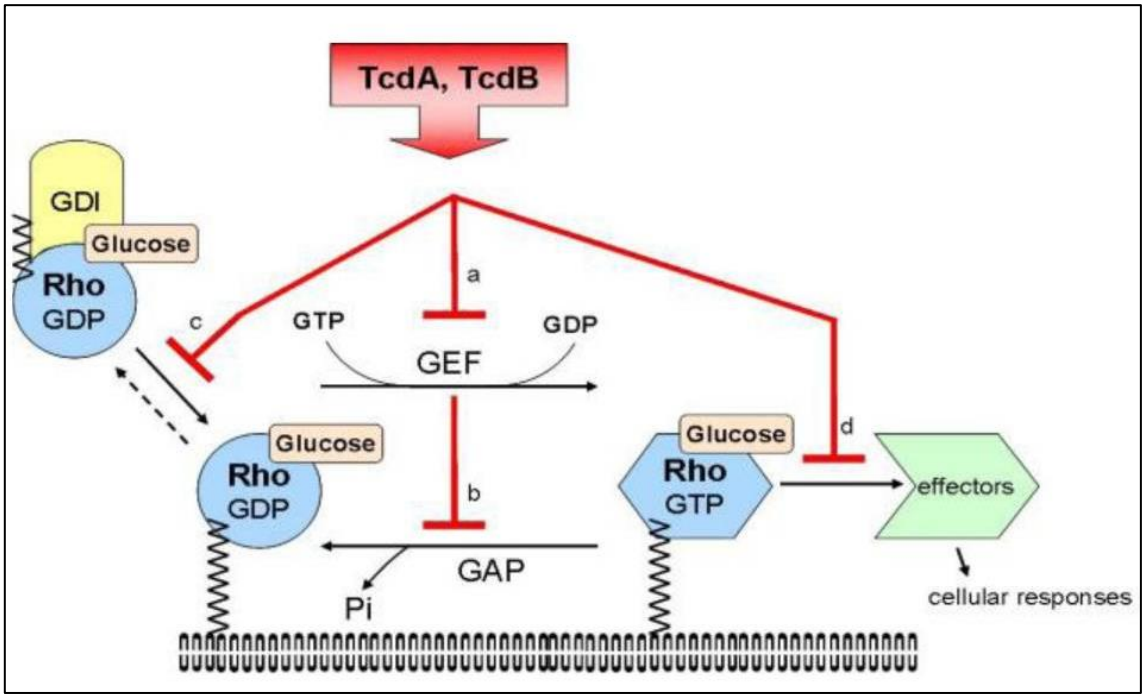
De cellulaire intoxicatie in darmepitheelcellen kan in vier stappen worden omschreven, waarbij elk toxinedomein van belang is (Figuur 1.5). (i) Eerst bindt het toxine, m.b.v. CROP's in de receptor bindende regio aan, een nog onbekende, receptor op het celoppervlak. (ii) Vervolgens worden TcdA en TcdB opgenomen in de cel d.m.v. clathrine-gemedieerde endocytose. Door de verzuring van de pH in het gevormde endosoom, ondergaan de toxines een conformationele verandering en worden de hydrofobe regio's blootgesteld. De hydrofobe regio's verplaatsen zich in het membraan en vormen zo poriën waardoor het enzymatisch domein getransporteerd wordt. (iii) Een auto-katalytisch proteasedomein verknipt het glycosyltransferase domein zodat deze in het cytosol vrijkomt. (iv) Als laatste migreert het glycosyltransferase naar het celmembraan en inactiveert het guanosine trifosfatasen (GTPasen) d.m.v. glycosylatie (Cubillos et al., 2010).



Figuur 1.5 Mechanisme van cellulaire intoxicatie door TcdA en TcdB. Het proces omvat vier stappen, gemedieerd door elk van de vier toxinedomeinen. (1) Het toxine bindt het celoppervlak en wordt opgenomen via receptor gemedieerde endocytose. (2) De verlaging van pH in de gevormde endosoom stimuleert porievorming waarna het glycosyltransferase getransporteerd wordt. (3) Het glycosyltransferase wordt

vrijgegeven in het cytosol m.b.v. auto-gekatalyseerde proteolyse. (4) Het glycosyltransferase glycolyseert de Rho GTPase eiwitfamilie aan het celmembraan. Figuur overgenomen uit Pruitt et al. (Pruitt et al., 2012)

Het glycosyltransferase werkt in op de Rho GTPase eiwitfamilie door mono-glycosylatie. Door de katalyse van een covalente glucosebinding aan een geconserveerd threonineresidu in de GTPase effectorregio wordt Rho functioneel inactief (Jank et al., 2008; Just et al., 1995a; Just et al., 1995b). Glycolisatie van Rho door TcdA en TcdB verhindert (i) de activering van de GTPasen door guanine nucleotide uitwisselingsfactoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEF), (ii) de hydrolyse door GTPase-activerende eiwitten (*GTPase-activating proteins*, GAP), (iii) de associatie met guanine nucleotide dissociatie inhibitors (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*, GDI); en (iv) de interactie met effectoreiwitten zoals downstream kinases en adaptoreiwitten (Figuur 1.6)(Cubillos et al., 2010).



Figuur 1.6 Inhibitie van de GTPase cyclus door TcdA en TcdB. Het GTPase, hier Rho, is inactief indien het GDP gebonden is en/of in het cytosol gehouden wordt door GDI (cirkel). Rho is actief indien het beide membraan geassocieerd en GTP gebonden (zeshoekig). De GTPase cyclus wordt gereguleerd door GEF en GAP die respectievelijk de uitwisseling van GDP tot GTP en de hydrolyse van GTP mediëren. Geactiveerde Rho bindt verschillende effectoren met een cascade aan downstream targets tot gevolg. Glycolisatie van Rho door TcdA en TcdB verhindert (a, b, c) de interactie met de regulerende eiwitten GEF, GAP en GDI; en (d) de interactie met de effectoren. Figuur overgenomen uit Cubillos et al. (Cubillos et al., 2010).

GTPasen, zoals Rho, zijn verantwoordelijk voor verschillende vormen van celregulatie; waaronder de vorm, beweeglijkheid en migratie van cellen. Door middel van (de)polymerisatie van actine beïnvloeden GTPasen het cytoskelet van de cel. Verstoring van Rho door TcdA en TcdB leidt tot een depolymerisatie van actine filamenten, met verzwakte cytoskeletintegriteit en cel-cel contact ter hoogte van de *tight junctions* van de intestinale epitheelcellen tot gevolg (Keel et al., 2006). De darmepitheelcellen komen los en ondergaan apoptose, waardoor weefselschade, vochtaccumulatie en een inflammatoire respons optreedt (Alouf et al., 2006; Riegler et al., 1995; Thelestam et al., 2006).

Terwijl het moleculair mechanisme van TcdA en TcdB volledig gekend is, blijven er vragen omtrent de aanleiding naar de inflammatoire processen van CDI's, zoals bij antibiotica-geassocieerde pseudomembraan colitis (Just et al., 1995a).

CDT

Een aantal *C. difficile* stammen produceren naast TcdA en TcdB een actine-specifieke adenosinedifosfaat (ADP) ribosyltransferase, of het binaire toxine (CDT)(Popoff et al., 1988; Stubbs et al., 2000). Het binaire toxine bestaat uit een enzymatische (CdtA; 50 kDa) en een bindende (CdtB; 100 kDa) subeenheid en is structureel homoloog aan het C2 toxine van *C. botulinum* en aan het I-toxine van *C. perfringens* (Barbut et al., 2005; Geric et al., 2006; Stubbs et al., 2000).

De CDT genen *cdtA* en *cdtB* liggen op het binaire toxine locus (CdtLoc) samen met *cdtR*, dat voor het regulerende eiwit CdtR codeert (Carter et al., 2007). Net als bij TcdA en TcdB wordt de expressie van CDT onderdrukt in de exponentiële groeifase door katabole repressie. In de stationaire groeifase wordt de expressie van CdtR, en dus van CDT, significant opgedreven (Dupuy et al., 1998). De regulerende factoren voor de expressie van CdtR is nog onbekend (Carter et al., 2007; Hundsberger et al., 1997).

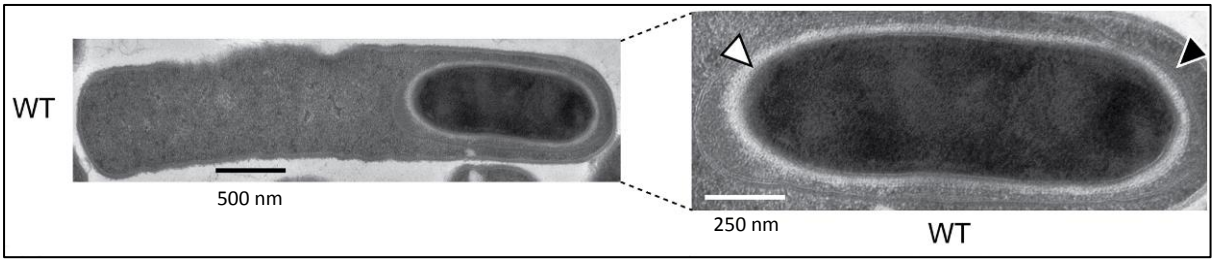
Het binaire toxine werkt in op het cytoskelet, meer bepaald op actine door middel van ADP-ribosylatie (Popoff et al., 1988; Stubbs et al., 2000). Omdat slechts weinig pathogene stammen het binaire toxine produceren is de rol in de pathogenese nog niet duidelijk (Barbut et al., 2005; Geric et al., 2006; Perelle et al., 1997; Rupnik et al., 2003). Sommige studies tonen de cytoxiciteit van het binaire toxine aan; terwijl andere studies aantonen dat avirulente *C. difficile* stammen (A^-B^-) die het binaire toxine produceren de darm *in vivo* koloniseren maar niet kunnen beschadigen (Geric et al., 2006; Perelle et al., 1997).

1.2.6 Andere virulentiefactoren

Naast toxines zijn er nog andere virulentiefactoren die bijdragen aan de virulentie van *C. difficile* zoals de vorming van sporen, de aanwezigheid van adhesie moleculen, de secretie van extracellulaire (hydrolytische) enzymen, de aanwezigheid van een *surface-exposed proteinaceous layer* (S-laag), zweepharen en fimbriae (Borriello, 1998; Borriello et al., 1990; Delmée et al., 1990; Karjalainen et al., 2001; Savariau-Lacomme et al., 2003; Sebaihia et al., 2006; Stabler et al., 2006; Waligora et al., 2001). De exacte rol van deze virulentiefactoren is meestal ongekend, toch is er een sterke aanwijzing naar hun rol in kolonisatie en ziekteverwekking. Enkel van twee toxines is het mechanisme volledig gekend.

Sporen

C. difficile sporen zijn erg belangrijk voor de overleving in extreme omstandigheden en dragen zo bij tot de virulentie van de kiem. De endosporen worden gevormd uit een precursorregio, de voorspore genaamd, die bestaat uit een cortex en een mantellaag (Figuur 1.7)(Fimlaid et al., 2013).



Figuur 1.7 *C. difficile* kiem en voorspore. TEM van *C. difficile* wild type (WT) stam JIR8094 na 18 u groei op sporenvormend medium. De voorspore, of de precursorregio van een spore, wordt aan de rechterkant van de figuur weergegeven. De zwarte pijlpunt toont de mantellaag van de voorspore, de witte pijlpunt toont de cortex van de voorspore. Zwarte schaalbalk, 500 nm; witte schaalbalk, 250 nm. Figuur overgenomen uit Fimlaid et al. (Fimlaid et al., 2013).

De omzetting van de bacterie naar zijn sporevorm gebeurt onder verschillende omstandigheden; bijvoorbeeld bij een lage pH, hoge temperatuur en als reactie op een antibioticumbehandeling (Rao et al., 2006). De sporen zijn resistent aan hitte, straling, droogte, zuurstof, antibiotica en allerlei chemicaliën zoals verschillende ontsmettingsmiddelen (Lawley et al., 2010). Het genetisch materiaal wordt beschermd door de dikke mantellaag waardoor de sporen erg lange tijd kunnen overleven zonder verlies aan leefbaarheid (Lawley et al., 2010). Bij gunstige omstandigheden; o.a. bij afwezigheid van zuurstof en bij aanwezigheid van nutriënten en ruimte; converteren de sporen terug naar de vegatieve vorm van *C. difficile* (Rao et al., 2006).

Adhesiemoleculen, extracellulaire enzymen en de S-laag

De bijdrage van adhesiemoleculen, extracellulaire enzymen en de S-laag aan de virulentie van *C. difficile* is nog grotendeels ongekend. Naast toxines wordt verwacht dat oppervlakte-eiwitten en extracellulaire enzymen en de S-laag een rol spelen. De oppervlaktelaag of S-laag is kristallaag die rond de celwand van verschillende micro-organismen ligt (Beveridge et al., 1997). Het bevat twee S-laag eiwitten (SLP's), waarvan één SLP geconserveerd is tussen de verschillende *C. difficile* stammen. Het andere SLP varieert in grootte en sequentie. Beide eiwitten worden gemaakt vanuit eenzelfde genproduct door post-translationele modificatie en hebben een amidase activiteit (Calabi et al., 2001; Spigaglia et al., 2011).

Onder invloed van verschillende stress-signalen; zoals osmotische druk, zuur en hitte shocks, worden er door *C. difficile* oppervlaktemoleculen geëxpresseerd die de adhesie aan de darmwand en zo de kolonisatie bevorderen (Spigaglia et al., 2011; Waligora et al., 2001). De adhesiemoleculen kunnen aan darmmucosa binden en zo een inflammatoire en antilichaam gemedieerde respons uitlokken (Ausiello et al., 2006; Calabi et al., 2002a; Drudy et al., 2004; Péchiné et al., 2005; Wright et al., 2005).

Zweepharen en fimbriae

Ook peritrieche zweepharen en polaire fimbriae zijn potentiële virulentiefactoren van *C. difficile*. Niet alle *C. difficile* stammen produceren fimbriae. Deze structuren zijn tot 6 µm lang en hebben een diameter van 4 – 9 nm (Borriello et al., 1988).

C. difficile stammen kunnen zich m.b.v. zweepharen *in vitro* hechten aan mucus van het caecum in muizen, en zo darmkolonisatie bevorderen (Tasteyre et al., 2000; Tasteyre et al., 2001). De zweephaareiwitten flagelline (FliC) en het *flagellar hook-associated protein 2* (FliD) zouden van belang zijn. Geflagelleerde stammen hebben een betere capaciteit om zich *in*

vivo te hechten aan mucus van het caecum in muizen, het FliD eiwit zou een rol hierin spelen. Zweepharen, en vooral FliD, zijn belangrijk voor de adhesie van de kiem (Tasteyre et al., 2001). Bij sommige *C. difficile* stammen blijken de structurele componenten van de zweepharen, en niet de motorfunctie, belangrijk te zijn voor de adhesie aan het darmepitheel en de kolonisatie tijdens infectie. Doordat dit niet bij alle *C. difficile* stammen het geval is, mogen conclusies over de pathogenese niet veralgemeend worden (Baban et al., 2013).

Bij fimbriae werd er geen direct verband gevonden tussen de aanwezigheid ervan en de toxigene status van de kiem (Borriello et al., 1988).

1.2.7 EPIDEMIOLOGIE

Na de ontdekking van *C. difficile* in de feces van pasgeborenen werd gedacht dat *C. difficile* deel uitmaakte van de normale darmflora (Hall et al., 1935). Later is aangetoond dat 60 – 70% van alle pasgeborenen en kinderen asymptomatisch worden gekoloniseerd door *C. difficile* (Bolton et al., 1984). Er wordt gedacht dat pasgeborenen en kinderen de receptoren voor binding van de door *C. difficile* geproduceerde toxines ontbreken waardoor *C. difficile* de darm kan koloniseren maar geen ziekte kan induceren. Bij 3% van de gezonde volwassenen is *C. difficile* asymptotisch aanwezig in de dikke darm (Bartlett, 1994; Ozaki et al., 2004; Shannon-Lowe et al., 2010).

INCIDENTIE

Er werd in 2005 in de Verenigde Staten een schatting gemaakt dat bij 7,4 per 1000 opgenomen patiënten CDI kan worden vastgesteld (Sohn et al., 2005). Gezien CDI's, en dus ook data omtrent de incidentie ervan, sterk afhangen van de geografische regio, de zorginstelling en soms zelfs de afdeling in hetzelfde ziekenhuis, is het moeilijk om een globaal cijfer erover te rapporteren (Bartlett, 1994; Lyerly et al., 1988; McDonald et al., 2007; Sohn et al., 2005). Algemeen ligt het cijfer van CDI-gevallen hoger in Noord-Amerika dan in Europa (Freeman et al., 2010; Humphreys et al., 2006). In België bedroeg de gemiddelde incidentie van alle CDI-gevallen in 2011 1,42 per 1000 opnamen in ziekenhuizen. De sterfte geassocieerd met enterocolitis ten gevolge van *C. difficile* bedroeg in 2009 in België 1,0 op 100.000 inwoners (Viseur et al., 2012).

Over de kosten die CDI's met zich meebrengen is het volgende geweten. Naar schatting gaat er 3 miljard euro in de Europese Unie per jaar; en 3 miljard dollar in de Verenigde Staten per jaar naar de behandeling van CDI's (Brazier, 2008; ECDC, 2012). Elke opgenomen patiënt die tijdens zijn/haar verblijf een CDI oploopt brengt een additionele kost van 2000 – 10.000 Dollar, of een verhoging van 38 – 78%, met zich mee (Dubberke et al., 2008; Vonberg et al., 2008a).

VERANDERING IN INCIDENTIE

Volgens het Amerikaans *Centre for Disease Control and Prevention* (CDC), krijgen 1/20 van de gehospitaliseerde patiënten een ziekenhuisgeassocieerde infectie (*healthcare associated infection* (HAI))(CDC, 2014). In Europa zijn er 15.000 HAI's gerapporteerd, waarvan 7,7% gastro-intestinale infecties. *C. difficile* is verantwoordelijk voor 48% van alle gastro-intestinale infecties (ECDC, 2012). Terwijl het voorkomen van de meeste types HAI daalt, blijft het aantal CDI's in ziekenhuizen hoog (Ghose, 2013).

In de laatste twee decennia is er een verschuiving opgemerkt in de epidemiologie van CDI's. CDI's werden oorspronkelijk gezien als een makkelijk te behandelen neveneffect van antibioticagebruik. Nu worden CDI's geassocieerd met uitbraken die een verhoogde mortaliteit en morbiditeit met zich meebrengen (Ghose, 2013). Zo zijn het aantal voorvallen gestegen van 31 op 100.000 patiënten in 1996 tot 84 op 100.000 patiënten in 2005; met een totaal aantal van 300.000 patiënten per jaar in de Verenigde Staten (Redelings et al., 2007). De mortaliteit is gestegen van 1.5% in 1997 tot 6.9% in 2004 en is in de Verenigde Staten gelinkt aan 14.000 doden per jaar (CDC, 2014; Kelly, 2012). In 2008 waren 93% van alle CDI gerelateerde doden patiënten ouder dan 65 jaar. Dit zet CDI's op de 18^{e} plaats van meest dodelijke aandoeningen in deze leeftijdscategorie (Lessa et al., 2012).

Naast een stijging in ziekenhuisgeassocieerde *C. difficile* infecties komen er alsmaar meer meldingen van uit de omgeving verworven *C. difficile* infecties, d.w.z. meer infecties bij mensen die niet in contact kwamen met de ziekenhuisomgeving of geen antibioticabehandeling kregen (Ghose, 2013). Tevens worden er meer infecties waargenomen bij jongere personen, zoals zwangere vrouwen en kinderen; en is er een stijging in infectie te zien bij een aantal diersoorten (ECDC 2012; Tamma et al., 2012).

In België zijn er geen argumenten voor een toename van de incidentie van de ernstige gevallen van CDI's verworven uit de omgeving, zoals hierboven beschreven voor andere landen. Wel is er een analoge evolutie van de incidentie van normaalvoorkomende CDI en in de sterfte ten gevolge CDI in ons land (Viseur et al., 2012).

STAM CD BR0027

De toegenomen virulentie van *C. difficile* hangt deels samen met de opkomst van de epidemische fluoroquinoloneresistante stam BI/NAP1/027 ofwel BR0027 (Ghose, 2013; Stabler et al., 2009). Deze zeer virulente stam van *C. difficile* werd voor het eerst gemeld in Europa in 2005. Hoewel BR0027 reeds gedefinieerd was in de jaren '80 in Québec, raakte de stam pas in 2000 bekend als de verantwoordelijke epidemische stam van CDI's (Loo et al., 2005; McDonald, 2005).

BR0027 is resistent aan verschillende fluoroquinolones zoals: levofloxacine, moxifloxacine, gatifloxacine en ciprofloxacine. Het gebruik van cefalosporines in ziekenhuizen, waaraan alle fluoroquinoloneresistante stammen resistent zijn, is een belangrijke risicofactor voor CDI's (Labbe et al., 2008; Loo et al., 2005). Naast een brede antibioticaresistentie heeft BR0027 nog enkele unieke eigenschappen. (i) Zo bevat het o.a. een 18-bp deletie in het *tcdC* gen, dat de expressie van de twee *C. difficile* toxinegenen *tcdA* en *tcdB* normaal gezien negatief reguleert. Deze deletie heeft mogelijks een verhoogde productie van toxine A en toxine B tot gevolg (Matamouros et al., 2007; Olling et al., 2012; Warny et al., 2005). (ii) De BR0027 stam bevat tevens de binaire toxinegenen *cdtA* en *cdtB* (Stiles et al., 2011). Het is mogelijk dat *C. difficile* stammen met CDT de effecten van TcdA en TcdB verhogen. Verder blijkt dat patiënten die een CDI hebben t.g.v. CDT-positieve stammen een hogere kans hebben om te hervallen (Stewart et al., 2013). (iii) Daarnaast is TcdB meer cytotoxisch, (iv) produceert het sneller sporen; en (v) is er een verband opgemerkt tussen de BR0027 variant van het S-laag eiwit SlpA en een verhoogde adhesie aan humane darmepitheelcellen (Åkerlund et al., 2008; Lanis et al., 2010; Merrigan et al., 2010; Stabler et al., 2008). Dit alles maakt de *C. difficile* BR0027 stam een van de meest pathogene bacteriën in ziekenhuisomgevingen.

CDI BIJ DIEREN EN ZOÖNOTISCH BELANG

CDI's werden als oorzaak voor enteritis in verschillende diersoorten geïdentificeerd. Zo kan *C. difficile* mogelijks enteritis en diarree veroorzaken in kalveren en varkens (Hammitt et al., 2008; Rodriguez-Palacios et al., 2006; Songer et al., 2006). Productiedieren, met name runderen, kalveren, varkens en kippen; kunnen mogelijks dienen als drager van toxine producerende *C. difficile* stammen (Indra et al., 2009; Jhung et al., 2008; Songer et al., 2006). Tevens werd de kiem geïsoleerd uit rundvlees, varkensvlees, kalfsvlees en kalkoensvlees die bedoeld waren voor menselijke consumptie. Dit suggereert dat *C. difficile* vanuit voedsel producerende dieren verspreid wordt door direct contact of door menselijke consumptie van sporen bevattend voedsel (Rodriguez-Palacios et al., 2006; Rupnik, 2007; Songer, 2010; Weese et al., 2010). Gezien de alom vertegenwoordiging van *C. difficile* en de lage incidentie van in de omgeving verworven CDI's (in vergelijking met ziekenhuis geassocieerde CDI's), is het zoönotisch belang in de epidemiologie van CDI's waarschijnlijk niet zo groot. Toch is de kolonisatie van *C. difficile* in productiedieren verontrustend omdat er in die sector veelvuldig en aselectief gebruik gemaakt wordt van antibiotica en dit de selectie op antibioticaresistente *C. difficile* stammen kan bevorderen (Gould et al., 2010).

1.2.8 DIAGNOSE

Om de makkelijke verspreiding van *C. difficile* in te perken, is het van groot belang dat de CDI zo snel mogelijk opgemerkt wordt. Daarnaast draagt een trage diagnose bij tot een langere ziekteduur en slechtere uitkomst van de CDI (Muto et al., 2007). Verschillende diagnostische technieken, en combinaties ervan, worden gebruikt voor de herkenning van symptomatische *C. difficile* in de patiënt.

CYTOTOXINE TEST

De gouden standaard voor de detectie van CDI's is een cytotoxine assay die de cytotoxiciteit van toxine B detecteert. TcdB, aanwezig in de feces van de patiënt, heeft namelijk een cytopathisch of schadelijk effect op zoogdiercellen. De techniek is zeer gevoelig maar heeft als nadelen dat het erg tijds- en arbeidsintensief is (Delmée, 2001; Kufelnicka et al., 2011).

CULTIVATIE STAM

De cultivatie op selectief media is niet aangeraden vermits ook avirulente *C. difficile* stammen gedetecteerd worden. Daarop aansluitend kan de gecultiveerde stam getest worden op de productie van toxines (cytotoxigene cultuur). Zo kan TcdB, en niet enkel de aanwezigheid van de bacterie in de feces, onderzocht worden. Deze techniek is selectief maar tijdrovend (Kufelnicka et al., 2011; Rupnik et al., 2009).

TOXINEDETECTIE KITS

Commercieel verkrijgbare toxinedetectie kits, zoals enzymatische toxine A en toxine B immunologische testen (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*, ELISA) en membraantesten, zijn een erg snelle en makkelijke manier om *C. difficile* te detecteren. Het gebruik van kits die de aanwezigheid van TcdA detecteren wordt afgeraden, gezien niet alle pathogene *C. difficile* stammen toxine A produceren (Lyras et al., 2009). Nadelen zijn de beperkte gevoeligheid en specificiteit (veel vals positieven) van de techniek (Crobach et al., 2009; Kufelnicka et al., 2011; Rupnik et al., 2009).

MOLECULAIRE DETECTIE

Met behulp van een polymerase kettingreactie (*polymerase chain reaction*, PCR) of kwantitatieve PCR (qPCR) kan de aanwezigheid van *C. difficile* toxinegenen op een zeer korte tijd en met een hoge betrouwbaarheid gedetecteerd worden. Toch zijn er enkele nadelen aan verbonden. Het gebruik van deze moleculaire technieken is een kostbare onderneming, er is gespecialiseerde apparatuur en personeel voor nodig. Daarnaast zegt de aanwezigheid van toxinegenen niets over de productie van de toxines zelf, ook avirulente *C. difficile* stammen die toxinegenen dragen maar niet produceren worden gedetecteerd met deze technieken (Crobach et al., 2009; Karre et al., 2011; Kufelnicka et al., 2011; Rupnik et al., 2009; Sloan et al., 2008).

GEURDETECTIE

C. difficile geassocieerde diarree wordt vaak herkend via een sterke, goed gekarakteriseerde geur. De gevoeligheid en specificiteit van geurdetectie door het ziekenhuispersoneel bedraagt respectievelijk 55 – 82% en 77 – 83%, wat te laag is voor een accurate diagnose. Wel kan deze voorspelling gebruikt worden als reden voor de preventieve afzondering van de patiënt in afwachting van een definitieve diagnose (Bartlett et al., 2008; Burdette et al., 2007; Johansen et al., 2002; Wilcox, 2007).

In 2012 werd de mogelijkheid onderzocht om honden als diagnostische techniek te gebruiken voor de herkenning van CDI's. Honden hebben namelijk een 100 maal sterker reukvermogen (Issel-Tarver et al., 1997). Een getrainde hond, genaamd Cliff, kan accuraat *C. difficile* in fecesstalen herkennen en zo voor een directe diagnose zorgen (Bomers et al., 2012). De gestelde diagnose dient gevalideerd te worden met andere CDI detectietechnieken.

TYPERING

Voor epidemische studies is het belangrijk om te weten welke *C. difficile* stammen verantwoordelijk zijn voor o.a. CDI uitbraken. Er zijn verschillende typeringstechnieken voor *C. difficile* zoals: PCR ribotypering, *pulsed-field* gelelektroforese (PFGE), *multiple-locus variable number tandem repeat analysis* (MLVA), restrictie endonuclease analyse (REA), toxinotypering, multi-locus sequentie typering (MLST) en geamplificeerd fragment lengtepolymorfisme (AFLP)(Rupnik et al., 2009).

1.2.9 PREVENTIE

HYGIËNE

Recent is ontdekt dat C*. difficile* sporen via gewassen bedlinnen voor crosscontaminatie in zorginstellingen zorgen (Hellickson et al., 2007). De sporen kunnen niet verwijderd worden door de gebruikte wastemperaturen en antibacteriële zepen; noch door de meeste ontsmettingsmiddelen (op basis van waterstofperoxide, quaternair ammonium of detergent) en op alcohol-gebaseerde handzepen (Gerding et al., 2008; Nerandzic et al., 2010). Chloor-gebaseerde ontsmettingsmiddelen inactiveren sporen bij een concentratie van 1000 *parts per million*, maar wordt door de corrosieve natuur, scherpe geur en kans op huid- en luchtwegirritaties liever niet gebruikt (Fawley et al., 2007; Wilcox et al., 2000). De sporen kunnen ook worden vernietigd door autoclavering (Gerding et al., 2008; Nerandzic et al., 2010).

Verder kan de transmissie van *C. difficile* sporen ingeperkt worden door de isolatie van symptomatische patiënten, een persoonlijke ziekhuisuitrusting (bv. wegwerpthermometers), het dragen van beschermende kledij en handschoenen door het personeel en het gebruik van gespecialiseerde ontsmettingsmiddelen. Deze maatregelen maken de behandeling van CDI's aanzienlijk duurder (Vonberg et al., 2008a; Vonberg et al., 2008b).

AANGEPAST ANTIBIOTICAGEBRUIK

Sommigen types antibiotica geven minder aanleiding tot CDI's dan andere zoals: vancomycine, gentamicine en penicilline (Davey et al., 2006; Davey et al., 2013). Vervanging van hoog-risico antibiotica naar deze types antibiotica is, theoretisch gezien, een goede oplossing. Het probleem bij overmatig gebruik is dat CDI's ook worden gestimuleerd (Wilcox et al., 2004).

Een betere oplossing is de inperking op het gebruik van de hoog-risico antibiotica. Studies waarin het breedspectrumantibioticagebruik ingeperkt werd, toonden aan dat aangepaste antibioticagebruik een goede preventiemethode voor CDI is (Wilcox et al., 2004).

1.2.10 BEHANDELING

ANTIBIOTICA

Momenteel worden bacteriële infecties bestreden met behulp van antibiotica. Er zijn meerdere redenen waarom het gebruik van antibiotica achterhaald is en er beter naar andere oplossingen wordt gezocht. De meeste antibiotica zijn breedspectrumantibiotica die werken tegen een hele reeks bacteriën met een grote verstoring van de normale microflora tot gevolg. Hierdoor krijgen resistente *C. difficile* stammen in de darm een selectief voordeel ter overleving en kolonisatie. Verder wordt er een stijging gezien in het aantal multiresistente *C. difficile* bacteriën; deze stammen zijn resistent aan verschillende soorten antibiotica op de markt (Ghose, 2013).

De behandeling van CDI's bestaat uit toediening van de breedspectrumantibiotica metronidazol en vancomycine (Zar et al., 2007). Metronidazol wordt als eerste keuze toegediend, maar is niet altijd even efficiënt en geeft soms aanleiding tot recidieven. Vancomycine wordt toegediend wanneer metronidazol geen effect meer heeft en is een laatste reddingsmiddel. Bij een milde vorm van CDI bleek de patiënt na infectie even snel te genezen met metronidazol (90%, n = 41) als met vancomycine (98%, n = 40)(Zar et al., 2007). Bij een ernstige vorm van CDI ging de genezing met vancomycine significant sneller (97%, n= 31) dan met metronidazol (76%, n = 38, p = 0,02)(Zar et al., 2007). Het spreekt voor zich dat met vancomycine zeer behoedzaam dient omgesprongen te worden, enerzijds om de ontwikkeling van nieuwe antibioticaresistente bacteriën tegen te gaan en anderzijds om infecties met vancomycineresistente enterococcen te vermijden. Tot nu toe zijn er nog geen vancomycineresistente *C. difficile* stammen gerapporteerd (Huang et al., 2009).

Sinds eind 1999 werden steeds meer patiënten gerapporteerd die hervielen na behandeling met metronidazol. Op een totaal van 2226 patiënten, waren er 294 patiënten (13,2%) die een recidiverende infectie kregen na behandeling met metronidazol. Na behandeling met vancomycine waren dit slechts 24 (3,4%) van de 708 patiënten. Toch is de kans op recidieven erg hoog; namelijk 20,2% bij behandeling met metronidazol en 18,4% bij vancomycine (Kelly, 2012).

Er wordt veel onderzoek gedaan naar alternatieve antibiotica die metronidazol en vancomycine kunnen bijstaan of zelfs vervangen. Zo werd het gebruik van rifamycines; zoals rifampine, rifaximin en rifalazil, reeds bestudeerd voor de behandeling van CDI's (Garey et al., 2009; Herpers et al., 2009; Johnson et al., 2007; Johnson et al., 2009). Rifampine vertoont activiteit tegen bepaalde *C. difficile* stammen, maar er zijn problemen met verworven antibioticaresistentie. *C. difficile* resistentie tegen rifampine ontstaat door mutaties in het rpoB gen, dat codeert voor de β-eenheid van het *C. difficile* RNA polymerase (O'Connor et al., 2008). Rifaximine kan preventief worden toegediend tegen recidiverende CDI. Voor het gebruik van rifaximine en rifalazil als primaire behandeling tegen recidiverende CDI is verder onderzoek noodzakelijk (Garey et al., 2009; Johnson et al., 2009). Nitazoxanide, een nitrothiazole benzamide behorende tot de rifalazils, levert gelijkaardige resultaten op als metronidazol en vancomycine in twee onafhankelijke gerandomiseerde studies (Musher et al., 2006; Musher et al., 2009). Fidaxomicine, een ander rifalazil, is een nauwspectrum macrolytisch antibioticum dat enkel activiteit vertoont tegen *C. difficile*, maar niet tegen andere Gram-positieve bacteriën. Het is het eerste goedgekeurde geneesmiddel, na vancomycine, voor de behandeling van CDI's in Europa en in Amerika (EMA, 2011; FDA, 2014).

Meta-analyse van andere potentiële antibiotica die op de markt zijn; onder meer met bacitracine, fusidinezuur en teicoplanines heeft uitgewezen dat deze alternatieven geen significant voordeel opleveren voor de behandeling van CDI's t.o.v. metronidazol en vancomycine (Dudley et al., 1986; de Lalla et al., 1992; Wenisch et al., 1996; Wullt et al., 2003; Young et al., 1985).

PROBIOTICA

Probiotica zijn enkelvoudige of gemengde culturen van levende micro-organismen die, bij toediening aan mens of dier, een positieve invloed hebben op de gastheer door de microbiële balans aan te passen. Zo kunnen probiotica de darmflora herstellen na een antibioticabehandeling, een bepaalde immuunrespons stimuleren, de productie van toxine degraderende enzymen activeren en/of de aanhechting van pathogene bacteriën aan de darmwand verhinderen (McFarland, 2000a). Verschillende studies hebben het voordelige effect van *Saccharomyces boulardii*, een aantal *Lactobacillus* stammen en *Bacillus coagulans* GBI-30 op recidiverende CDI's aangetoond, meestal in combinatie met toediening van metronidazol of vancomycine (McFarland et al., 2000b).

Zo werd een significante daling in het aantal recidieven gezien indien een hoge dosis vancomycine werd gecombineerd met *S. boulardii* in vergelijking met de placebo die enkel vancomycine bevatte. *S. boulardii* kan, door proteolytische activiteit en sterische hindering, de aanhechting van *C. difficile in vitro* inhiberen (Tasteyre et al., 2002). Bij het gebruik van lage dosissen vancomycine of metronidazol gecombineerd met *S. boulardii* werd er geen effect gezien op het aantal recidiverende infecties (McFarland, 2005).

Naast *S. boulardii* werd ook *Lactobacillus*, in combinatie met vancomycine of metronidazol, getest als behandeling tegen primaire en recidiverende CDI's. In een eerste studie werd het effect van metronidazol met en zonder *Lactobacillus plantarum* 299v getest bij patiënten met recidiverende CDI (Wullt et al., 2003). Een tweede studie testte het effect van metronidazol of vancomycine, afhankelijk van de behandeling bij de oorspronkelijke CDI, met en zonder *Lactobacillus rhamnosis GG* (LGG) bij patiënten met een recidiverende CDI (Lawrence et al., 2005). Bij beide studies werd geen significant effect waargenomen in

vergelijking met de placebo die enkel het antibiotica bevatte (Lawrence et al., 2005; Pochapin, 2000). Wanneer enkelvoudige en gemende *Lactobacillus* culturen vergeleken werden, bleek dat een combinatie van *L. acidophilus* CL1285 en *L. casei* DN-114 001 een significant verschil op de preventie van CDI's vertoonden; maar enkelvoudige culturen van *L. plantarum* en *L. rhamnosus* niet (Hickson, 2011; Wu et al., 2013).

Bacillus coagulans GBI-30, 6086 (BC30) is een probiotische stam die de vrijstelling van chemokines zowel *in vitro* als *in vivo* kan beïnvloeden. In muizen vermindert het probioticum de influx van neutrofielen en zo darmontstekingen geassocieerd met CDI's (Fitzpatrick et al., 2011; Fitzpatrick et al., 2012).

Over het algemeen wordt het gebruik van probiotica in de geneeskunde niet aangeraden omwille van meerdere redenen. Zo zijn er onvoldoende bewijzen van de efficiëntie van probiotica zowel als aanvulling op antibiotica of als enige behandeling bij *C. difficile* colitis (Pillai et al., 1996). Daarnaast zijn er drie theoretische risico's verbonden met het gebruik van probiotica die vaak worden aangehaald bij de goedkeuring van een nieuwe probioticumtherapie. (i) Allereerst dient het voorkomen van probiotica-gemedieerde ziekten, zoals bacteriëmie en endocarditis onderzocht te worden. (ii) Ten tweede dient het toxisch en metabolisch effect van probiotica op de darmwand; en de potentiële transmigratie ervan bestudeerd te worden. Probiotica kunnen mogelijks de doorgang doorheen de darmwand bevorderen en in de bloedstroom terechtkomen. (iii) Een derde en erg belangrijk punt dat gecontroleerd moet worden, is de potentiële uitwisseling van antibioticaresistentie genen tussen probiotica en pathogene bacteriën in de darmflora (Snydman, 2008).

PASSIEVE IMMUNISATIE EN VACCINATIE

Er is aangetoond dat de immuunrespons een belangrijke risicofactor is voor de impact van CDI's op patiënten. Toediening van IgG, zowel oraal als intraveneus (*Intravenous immunoglobulin*, IVIG), werden reeds bestudeerd als behandeling bij ernstige gevallen van CDI's. Bij IVIG therapie worden polyvalente IgG antilichamen uit het plasma van duizenden bloeddonoren gepoold en intraveneus toegediend aan de patiënt (passieve immunisatie). Studies wijzen op het voordeel van een IVIG behandeling bij zware recidiverende CDI's. Helaas kan er uit deze kleinschalige studies, zonder negatieve controlegroepen in drie van de vier studies, niets worden afgeleid omtrent de aanbevelingen voor het klinisch gebruik van intraveneus immunoglobuline. Verder onderzoek moet de potentiële rol van immunoglobuline therapie bij CDI's uitwijzen (O'Horo et al., 2009).

Daarnaast werden *C. difficile* oppervlakte-eiwitten als antigen gebruikt voor passieve immunisatie (O'Brien et al., 2005). Deze oppervlakte eiwitten, voornamelijk SLP's, spelen een belangrijke rol in de adhesie en kolonisatie van *C. difficile* tijdens infectie (Calabi et al., 2002b; Spigaglia et al., 2011). Zo werd het oppervlakte-eiwit *flagellar cap protein* getest als antigen op muizen. Toediening via het rectum bleek het meest efficiënt te zijn en de muizen hadden significant minder *C. difficile* in de darm (Péchiné et al., 2007). Tot nog toe werd geen enkel vaccin goedgekeurd door de *Food and Drug Administration* (FDA)(Ghose, 2013).

C. difficile toxine gebaseerde vaccins (actieve immunisatie) werden reeds ontwikkeld voor de behandeling van CDI's en de 2^{e} fase van de klinische studies werden met succes doorlopen (Kaslow et al., 2011). De twee nieuwe humane monoclonale antilichamen MDX-066 (CDA-1) en MDX-1388 (CDB-1), ontwikkeld door *Massachusetts Biologic Laboratories* (MBL) kunnen TcdA en TcdB van *C. difficile* succesvol binden en neutraliseren (MBL, 2008).

Fecale bacterio-therapie

Fecale bacterio-therapie, ofwel het transplanteren van gezonde feces naar een patiënt, is een eenvoudige en zeer efficiënte methode om antibiotica gerelateerde darminfecties op te lossen. De bacteriële flora van de gedoneerde feces herstelt de verstoorde darmflora waardoor (opportunistische) pathogene bacteriën niet meer kunnen overheersen in de darm (Huovinen, 2001). Hierbij is gezien dat 90% van de geteste patiënten geen recidiverende CDI krijgt (van Nood et al., 2013; Tvede et al., 1989).

Daarnaast werd reeds een volledige darmspoeling toegepast als behandeling bij ernstige CDI's, waarbij getracht werd om de pathogene toxines uit de darm te spoelen (Liacouras et al., 1996). Er zijn momenteel nog geen grootschalige studies hierover gepubliceerd.

Hoewel fecale bacterio-therapie op het eerste zicht een erg makkelijke oplossing voor CDI's lijkt; dient deze techniek, en de potentiële gevaren ervan, eerst met onafhankelijke lange termijn studies geëvalueerd te worden. Gezien elke patiënt en de samenstelling van elk gedoneerd fecesstaal verschillend is, kunnen er problemen met tolerantie of andere pathogene bacteriën, virussen, enz. optreden na transplantatie en is standaardisatie noodzakelijk (Mole, 2013).

Toxinebindende componenten

Een mogelijke behandeling bestaat uit geabsorbeerde componenten die de door *C. difficile* geproduceerde toxines binden in de darm. Hierdoor kunnen de toxines geen enterocyten meer binden en dus ook geen ziekte meer induceren. Verschillende absorptiemiddelen zijn getest en geëvalueerd zoals ion-uitwisselbare harsen, oligosacchariden en verschillende types polymeren.

De resultaten die bekomen werden met ion-uitwisselbare harsen zijn tegenstrijdig. Enerzijds is aangetoond dat binding van het *C. difficile* toxine met het resine cholestyramine de dood in hamsters uitstelt (Taylor et al., 1980). Anderzijds werd er geen verschil gezien in de fecale excretie van het *C. difficile* toxine met of zonder toediening van de ion-uitwisselbare hars colestipol (Mogg et al., 1982). De hoofdreden waarom ion-uitwisselbare harsen nooit algemeen gebruikt zullen worden, is dat deze niet in combinatie met alle antibiotica kunnen toegediend worden vanwege hun antibioticumbindende eigenschappen.

Sommige polymeren, bijvoorbeeld synsorb 90, hebben de eigenschap om het binaire toxine van *C. difficile* te binden. Synsorb 90 is een oligosacharide gebonden aan een inerte polymeer-matrix die een toxinereceptor (*decoy toxin receptor*) imiteert en zo de vloeibare stoelgang vermindert in rat ileum modellen van CDAD (Castagliuolo et al., 1996; Heerze et al., 1994). Alhoewel initiële experimenten met dierenmodellen goede resultaten opleverden en testen een significante verlaging in het recidiveren aantoonden, is de ontwikkeling ervan stopgezet.

Een tweede polymeer, tolevamer genaamd, is getest bij patiënten met een eenmalige en reviderende CDI (Barker et al., 2006). Tolevamer, vancomycine en metronidazol werden getest in twee onafhankelijke gerandomiseerde studies. Daaruit bleek dat de efficiëntie van tolevamer beduidend lager lag in vergelijking met vancomycine en metronidazol. Hierdoor werd de verdere ontwikkeling van het geneesmiddel stopgezet (Weiss, 2009).

Sporenvorming inhibitors

CamSA is een galzuurderivaat die de sporenvorming van *C. difficile* stammen verhindert. Hiervoor werd CamSA in combinatie met antibioticum aan muizen gegeven voor, tijdens en

na toediening van *C. difficile* sporen. Muizen met CamSA waren, op een dosis-afhankelijke wijze, beschermd tegen CDI's. De muizen met de hoogste dosis CamSA hadden geen symptomen van CDI en hun feces bevatte intacte *C. difficile* sporen maar geen bacteriële vorm. Omdat CamSA niet werkzaam is tegen de bacteriële vorm van *C. difficile,* kan het nooit als alleenstaande behandeling gebruikt worden (Zuger, 2013).

BACTERIOCINES

Bacteriocines zijn antimicrobiële eiwitten geproduceerd door bacteriën die specifiek de groei van gerelateerde bacteriële stammen gaan inhiberen (Cleveland et al., 2001). Er bestaan bacteriocines, bijvoorbeeld lacticin 3147, die actief zijn tegen een brede waaier aan bacteriën inclusief *C. difficile* (Dobson et al., 2011). Door hun breedspectrumactiviteit hebben deze bacteriocines een grote invloed op de darmflora, wat ze minder geschikt maakt als therapeutisch middel tegen CDI's. Daarnaast bestaan er ook bacteriocines die een nauwspectrumactiviteit tegen *C. difficile* stammen vertonen zoals thuricine CD (Rea et al., 2010; Rea et al., 2014). Dit bacteriocine, geproduceerd door *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus HD198, werkt zeer actief tegen *C. difficile* en *Listeria monocytogenes*, zonder activiteit te vertonen tegen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* sp. of andere Gram-positieve organismen aanwezig in het spijsverteringskanaal. De grootste uitdaging bij het klinisch gebruik van bacteriocines is om het product in de darm te krijgen zonder verlies van activiteit tegen *C. difficile* (Deegan et al., 2006).

LIPOPEPTIDEN

Lipopeptiden zijn peptiden gekoppeld aan hydrofobe lipiden en kunnen een antibacteriële activiteit vertonen. Het cyclische lipopeptide CB-183,315 bijvoorbeeld vertoont antibacteriële activiteit tegen *C. difficile*, methicillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), andere *Clostridium* spp. en *Peptostreptococcus* spp. Het heeft een grotere activiteit tegen *C. difficile* stammen dan vancomycine en metronidazol en is actiever tegen vancomycineresistente enterococcen (VRE) dan andere behandelingen (Citron et al., 2012; Snydman et al., 2012). CB-183,315 heeft reeds fase 2 van de klinische studies met succes doorlopen en heeft dus een groot potentieel om als klinische toepassing tegen CDI's gebruikt te worden (Mascio et al., 2012).

2. DOELSTELLING

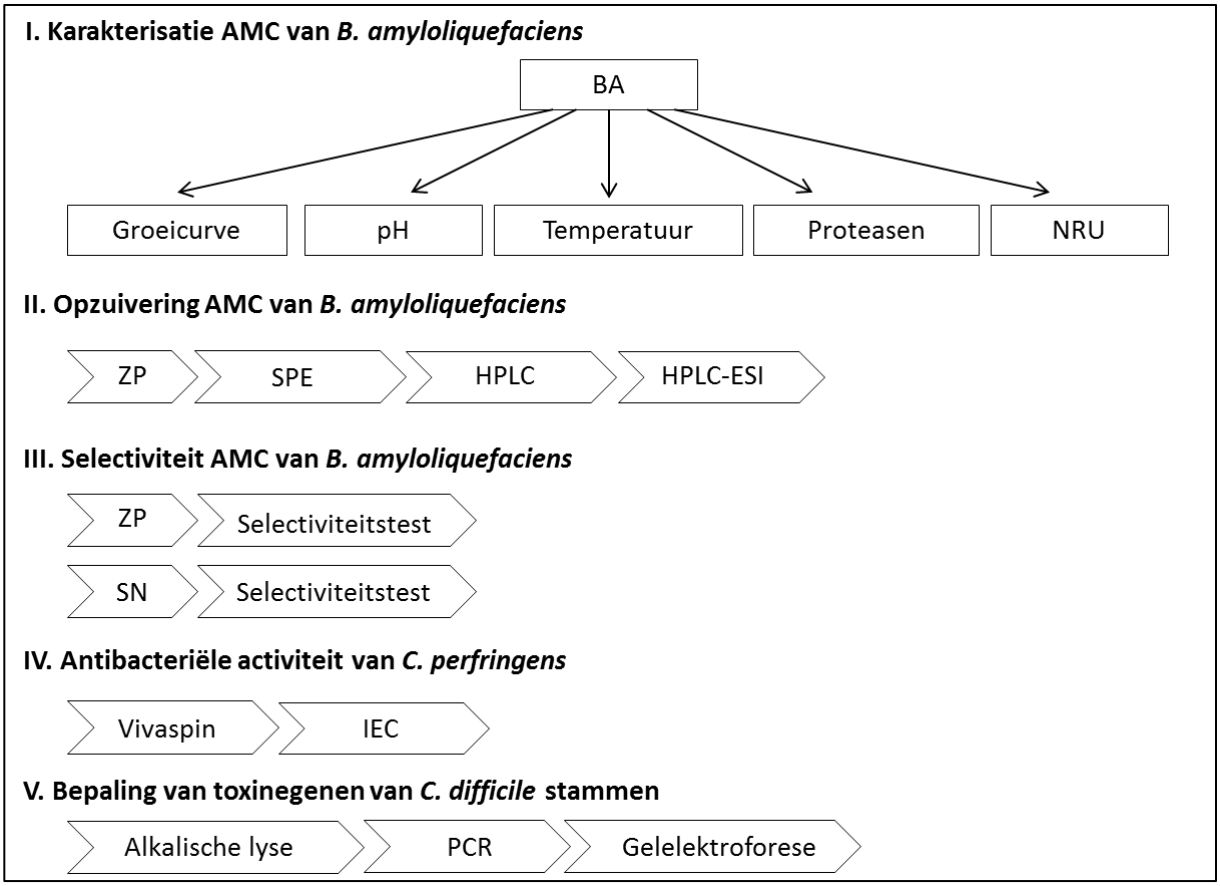
Verstoring van de darmflora door het gebruik van breedspectrumantibiotica is een belangrijke trigger voor de ontwikkeling van CDI's. Gezien de wereldwijde toename in het aantal en de ernst van *Clostridium difficile* infecties, de verminderde efficiëntie van metronidazol en vancomycine tegen *C. difficile* en om de ontwikkeling van antibioticaresistentie tegen te gaan; dient er gezocht te worden naar een alternatieve oplossing voor de huidige antibioticabehandeling. Antimicrobiële componenten die een nauwspectrumactiviteit vertonen tegen *C. difficile* stammen en andere niet-pathogene darmbacteriën onaangetast laten, kunnen mogelijks een oplossing bieden.

Voorafgaand onderzoek aan de vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten (Faculteit Diergeneeskunde, Ugent) toonde aan dat een bepaalde *B. amyloliquefaciens* stam en een *C. perfringens* stam een sterke *in vitro* antibacteriële activiteit bezitten tegen een collectie *C. difficile* stammen.

Het doel van deze thesis is het opzuiveren, karakteriseren en identificeren van antimicrobiële componenten (AMC) tegen *Clostridium difficile*. Hiervoor werd het supernatans van een bepaalde *B. amyloliquefaciens* stam (BA) en van *C. perfringens* stam 38 (CP38) onderzocht. Naast de karakterisering van de onbekende antibacteriële componenten is het tevens belangrijk om de selectiviteit ervan tegen andere bacteriële stammen te onderzoeken. Bijkomend onderzoek werd gevoerd naar de toxinegenen van verschillende *C. difficile* stammen. Als blijkt dat deze AMC's een sterke antibacteriële activiteit vertonen tegen *C. difficile*, niet cytotoxisch zijn en weinig niet-pathogene darmbacteriën doden, kunnen ze mogelijks als behandeling voor CDI gebruikt worden.

2.1 WORKFLOW

Het onderzoek spitst zich toe op vijf verschillende luiken (Figuur 2.1). (i) In het eerste luik werd de AMC van *B. amyloliquefaciens*, aanwezig in het supernatans (SN), gekarakteriseerd. Hiervoor werden de volgende zaken getest; het tijdstip van de maximale productie; de invloed van pH, de temperatuur en verschillende proteasen op de activiteit van de AMC; en het effect van de AMC op humane epitheliale colorectale adenocarcinoomcellen (Caco-2) via een *neutral red uptake* (NRU) assay. (ii) In het tweede luik werd getracht om de AMC op te zuiveren en te identificeren d.m.v. de volgende scheidingstechnieken: zuurprecipitatie (ZP), *solid phase extraction* chromatografie (SPE), *high pressure liquid* chromatografie (HPLC) en *high pressure liquid* chromatografie-elektrospray ionisatie (HPLC-ESI) massaspectrometrie (MS). (iii) In het derde luik werden verschillende bacteriële stammen getest op gevoeligheid aan de AMC. Zowel het opgeconcentreerde BA SN (d.m.v. ZP) als gewoon supernatans werden gebruikt hiervoor. (iv) In het vierde luik werd de AMC, afkomstig van *C. perfringens* (CP) supernatans, opgezuiverd d.m.v. membraan ultrafiltratie (vivaspin), anion- en kation-uitwisselingschromatografie (*ion exchange* chromatografie, IEC); en werd de antibacteriële activiteit ervan tegen *C. difficile* getest. (v) In het vijfde luik werden de toxinegenen van een collectie *C. difficile* (CD) stammen bepaald.



Figuur 2.1 Overzicht van de workflow.

3. RESULTATEN

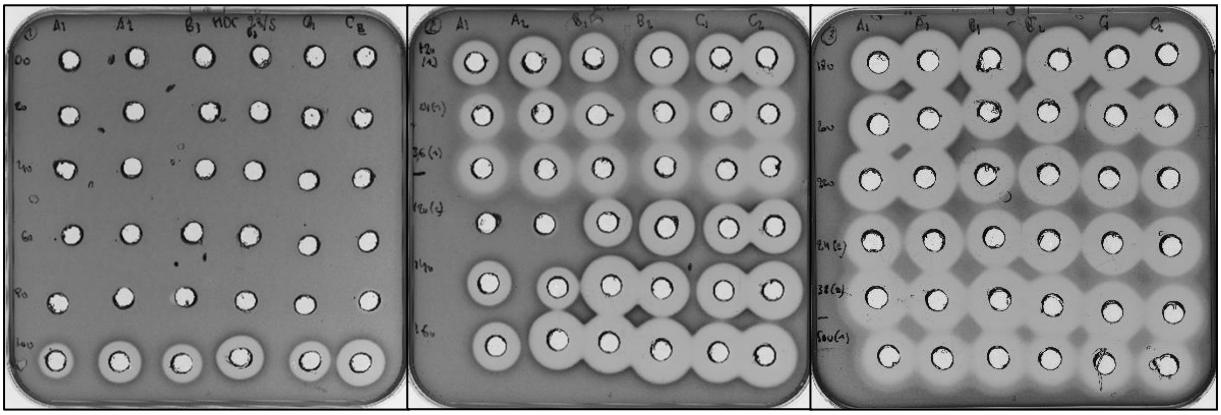
BIJDRAGE VAN DERDEN

- Professor Bart Devreese en Isabelle Vandenberghe voor het fractioneren van de AMC SPE fracties m.b.v. HPLC (Paragraaf 3.2.2).
- Professor Lynn Vanhaecke en Mieke Naessens voor het fractioneren en uitvoeren van massaspectrometrie m.b.v. HPLC-ESI MS (Paragraaf 3.2.3).

3.1 KARAKTERISATIE AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

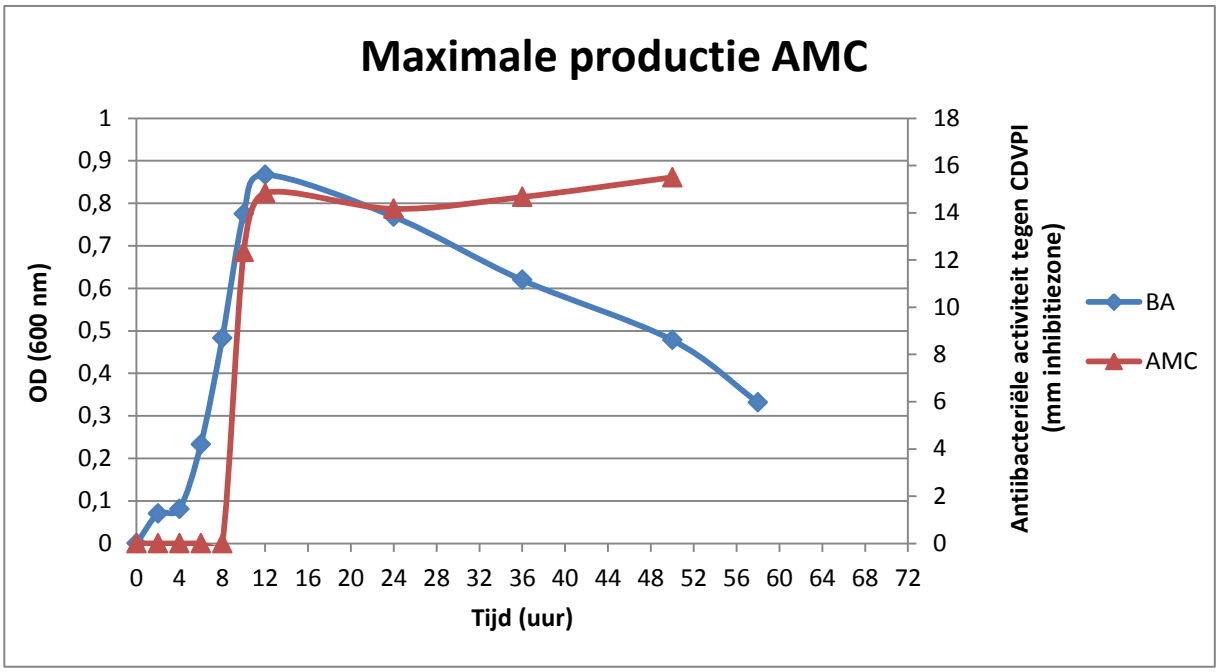
3.1.1 MAXIMALE PRODUCTIE AMC

Door een *B. amyloliquefaciens* groeicurve op te stellen, werd er een verband gezocht tussen de bacteriële groei en de productie van de AMC. Hiervoor werd de groei van *B. amyloliquefaciens* enerzijds gevolgd aan de hand van een titratietest en optische densiteit (OD) metingen (Tabel 7.1). Anderzijds werd gekeken in welke groeifase de AMC werd geproduceerd door de activiteit van het *B. amyloliquefaciens* supernatans te testen tegen de *C. difficile* typestam VPI (CDVPI) m.b.v. een agar well diffusietest (Figuur 3.1).



Figuur 3.1 Resultaat van agar well test met BA SN. De antibacteriële activiteit van de AMC werd bij elk tijdstip gemeten a.d.h.v. een agar well diffusietest.

Uit de resultaten blijkt dat BA eerst tot de stationaire fase groeit (10 – 12 uur), vooraleer de productie van de AMC begint (na 10 uur)(Figuur 3.2). De antibacteriële activiteit van het BA SN blijft gedurende heel de stationaire fase hoog, namelijk gemiddeld 15,5 mm inhibitiezone na 50 uur groei (Figuur 3.2).

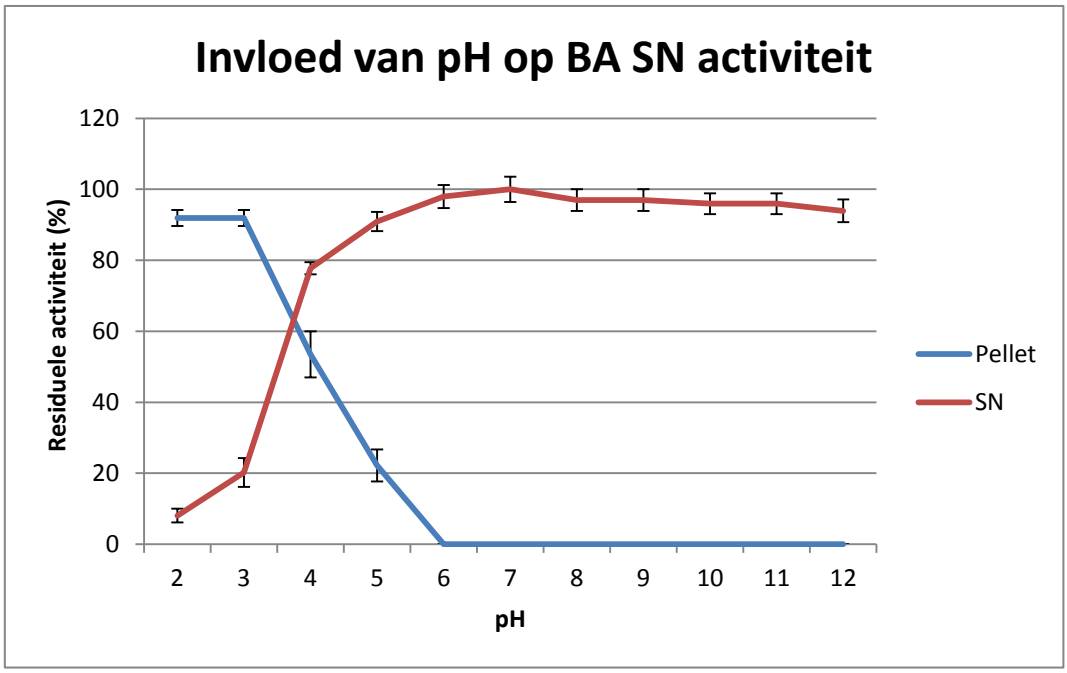


Figuur 3.2 BA groeicurve en antibacteriële activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans. De maximale productie van de AMC werd bepaald a.d.h.v. een BA groeicurve, waarbij de antibacteriële activiteit tegen CDVPI bij elk tijdstip gemeten werd a.d.h.v. een agar well diffusietest (in mm inhibitiezone).

3.1.2 Invloed van pH

Om te weten in welke pH-range de AMC van BA actief is, werd de antibacteriële activiteit van BA SN tegen CDVPI gemeten na incubatie bij verschillende pH-waarden (Tabel 7.1). Indien het staal onder invloed van de pH precipiteert, zal het zich na centrifugeren in de onderste fase (pellet) bevinden. Blijft de AMC in zijn native toestand, dan zal het zich na centrifugeren in de bovenste fase (supernatans) bevinden.

De antibacteriële activiteit in het supernatans bleef behouden bij een pH hoger dan 4 maar ging verloren bij pH 2 en 3. Bij de pH-waarden 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 en 12 werd er gemiddeld een residuele inhibitie gemeten van 77,8%; 90,9%; 98,0%; 97,0%; 97,0%; 96,0%; 96,0% en 94,0% in vergelijking met een staal met onveranderde pH (Figuur 3.3). De activiteit van de AMC kon worden hersteld door het gevormde zuurprecipitaat opnieuw op te lossen en te neutraliseren. In de opgeloste pellet van pH 2 en 3 werd gemiddeld een residuele inhibitie van respectievelijk 92,0% en 92,0% gemeten (Figuur 3.3).

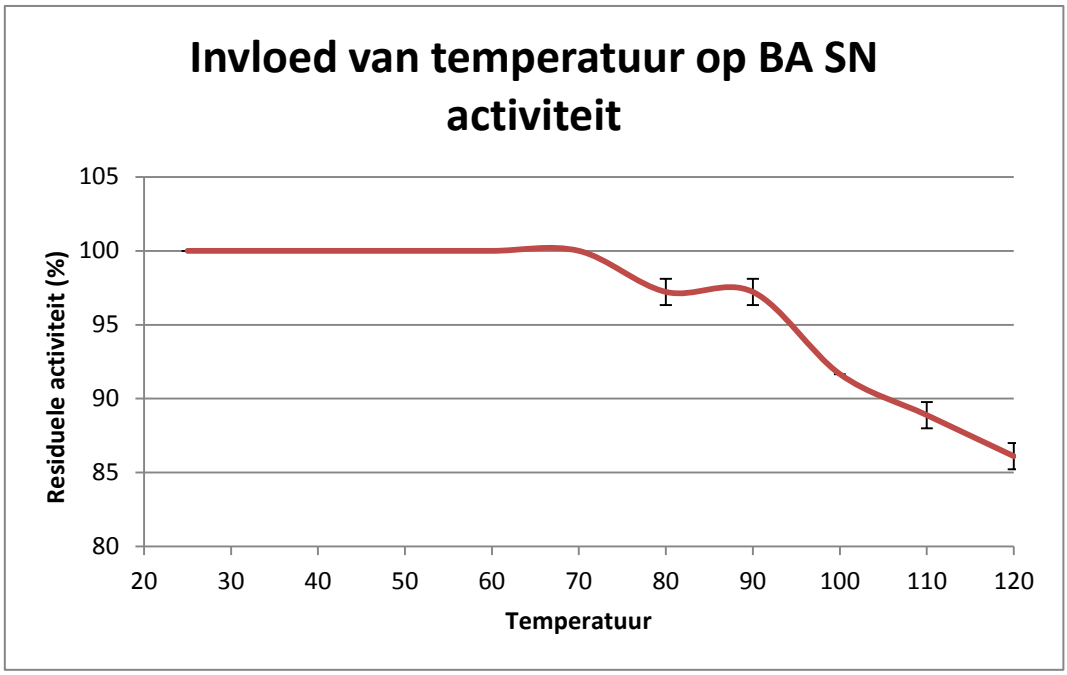


Figuur 3.3 Invloed van pH op de activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans. De pH-stabiliteit werd getest door SN te incuberen bij verschillende pH-waarden. Via een agar well diffusietest werd de hoeveelheid residuele inhiberende activiteit tegen CDVPI bepaald en uitgedrukt t.o.v. een onbehandeld controlestaal (in percent ± standaarddeviatie). "Pellet", onderste fase van BA SN na centrifugeren; "SN", bovenste fase van BA SN na centrifugeren.

3.1.3 Invloed van temperatuur

Om de hittestabiele eigenschappen van de AMC te kennen, werden BA SN stalen bij verschillende temperaturen geïncubeerd en vervolgens getest op de antibacteriële activiteit tegen CDVPI m.b.v. een agar well diffusietest (Tabel 7.1).

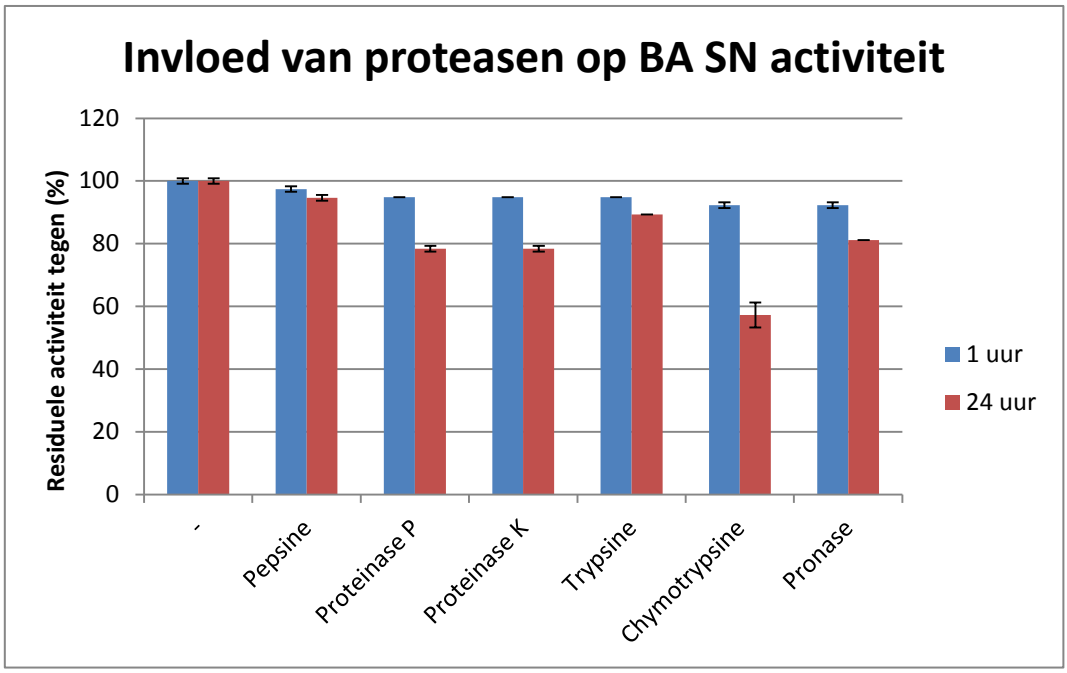
De gemiddelde activiteit van het supernatans bleef relatief constant tot een temperatuur van 100°C. Het SN vertoonde immers een residuele activiteit van >90% in vergelijking met een onbehandeld staal bij kamertemperatuur (Figuur 3.4). Verdere incubatie bij een hogere temperatuur tot 120°C liet de activiteit geleidelijk afzakken tot een residuele activiteit 86,1% (Figuur 3.4).



Figuur 3.4 Invloed van temperatuur op de activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans. De hittestabiliteit van de AMC werd onderzocht door BA SN bij verschillende temperaturen te incuberen. Vervolgens werd de residuele antibacteriële activiteit tegen CDVPI bepaald m.b.v. een agar well diffusietest en uitgedrukt t.o.v. een onbehandeld controlestaal (in percent ± standaarddeviatie).

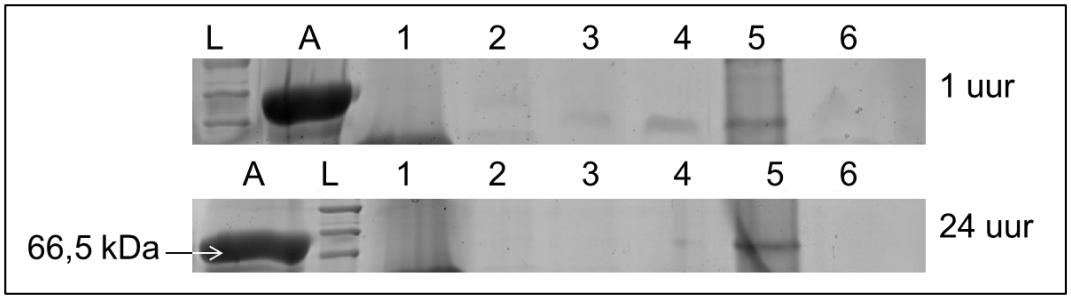
3.1.4 Invloed van proteasen

Om het effect van verschillende proteasen op de AMC te kennen, werd BA SN in aanwezigheid van proteasen geïncubeerd (Tabel 7.1). Na 1 u incubatie bij 37°C bleek de AMC erg resistent te zijn voor protease-gemedieerde afbraak. Er werd een residuele activiteit van 97,4%; 94,9%; 94,9%; 94,9%; 92,3% en 92,3% vastgesteld na incubatie met respectievelijk pepsine, proteinase P, proteinase K, trypsine, chymotrypsine en pronase (Figuur 3.5). Na 24 u incubatie bij 37°C bleek de AMC minder resistent te zijn tegen de proteasen. De residuele activiteit t.o.v. CDVPI bleef ongeveer behouden bij pepsine (94,7%), en zakte het meest drastisch bij chymotrypsine (57,3% ± 4)(Figuur 3.5).



Figuur 3.5 Invloed van proteasen op de activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans. De proteolytische resistentie van de AMC werd nagegaan door BA SN te incuberen in aanwezigheid van verschillende proteasen. De residuele antibacteriële activiteit werd tegen CDVPI bepaald m.b.v. een agar well diffusietest en uitgedrukt t.o.v. een onbehandeld controlestaal (in percent ± standaarddeviatie). "-", negatieve controle.

Om zeker te zijn dat de proteasen actief waren, werden deze geïncubeerd in aanwezigheid van albumine. Proteolytische afbraak van albumine werd nagegaan m.b.v. SDS-PAGE. Bij de negatieve controle, met alleen toegevoegd albumine, is er een bandje te zien bij 66,5 kDa (Figuur 3.6). Dit komt overeen met het moleculaire gewicht van albumine. In aanwezigheid van de proteasen pepsine, proteinase P, proteinase K, trypsine, chymotrypsine en pronase is er geen bandje te zien ter hoogte van 66,5 kDa (Figuur 3.6). Hieruit blijkt dat alle proteasen



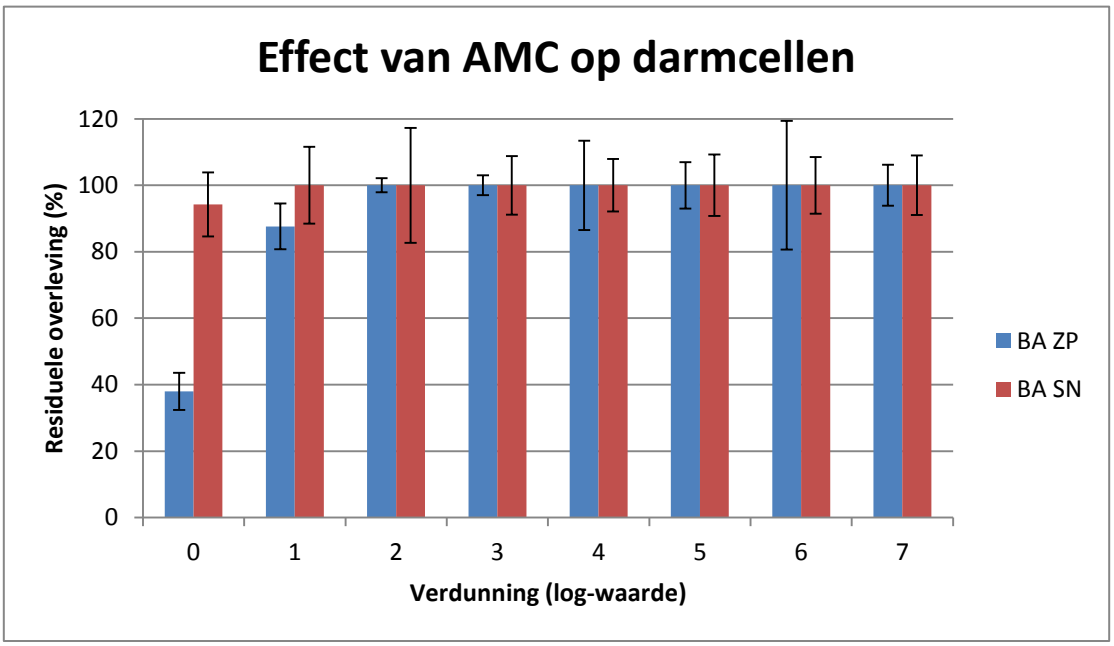
daadwerkelijk albumine afbreken na 1 u en na 24 u incubatie.

Figuur 3.6 Invloed van proteasen op albumine. De proteolytische resistentie van verschillende proteasen (pepsine, proteinase P, proteinase K, trypsine, chymotrypsine en pronase) werd onderzocht a.d.h.v. SDS-PAGE en Coomassie Brilliant Blue kleuring. "L", Pageruler Unstained Protein Ladder bandjes van 85, 70 en 60 kDA; "A", 1 mg/ml albumine; "1", 1 mg/ml albumine met 1 mg/ml pepsine; "2", 1 mg/ml albumine met 1 mg/ml proteinase P; "3", 1 mg/ml albumine met 1 mg/ml proteinase K; "4", 1 mg/ml albumine met 1 mg/ml trypsine; "5", 1 mg/ml albumine met 1 mg/ml chymotrypsine en "6", 1 mg/ml albumine met 1 mg/ml pronase.

3.1.5 Effect van BA SN op darmcellen *in vitro*

Om na te gaan of BA *in vivo* kan gebruikt worden, werd de cytotoxiciteit van het supernatans bepaald m.b.v. Caco-2 m.b.v. een NRU assay (Tabel 7.1).

De residuele overleving voor onverdund BA SN is 94,2% in vergelijking met het effect van het TSB medium op Caco-2 cellen (Figuur 3.7). Het opgeconcentreerde supernatans (BA ZP) is cytotoxischer voor Caco-2 cellen dan gewoon BA SN (Figuur 3.7). Het onverdunde BA ZP heeft slechts een residuele overleving van 38,0% (Figuur 3.7). Vanaf een 100 maal verdunning van BA ZP is de residuele overleving dezelfde als voor BA SN, namelijk 100% in vergelijking met het TSB medium (Figuur 3.7).



Figuur 3.7 Effect van *B. amyloliquefaciens* supernatans op darmcellen *in vitro*. Het cytotoxisch effect van de BA ZP en BA SN werd bestudeerd op Caco-2 cellen m.b.v. een NRU assay. "BA ZP", opgeconcentreerde BA supernatans m.b.v. zuurprecipitatie; "BA SN", BA supernatans.

3.2 OPZUIVERING AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

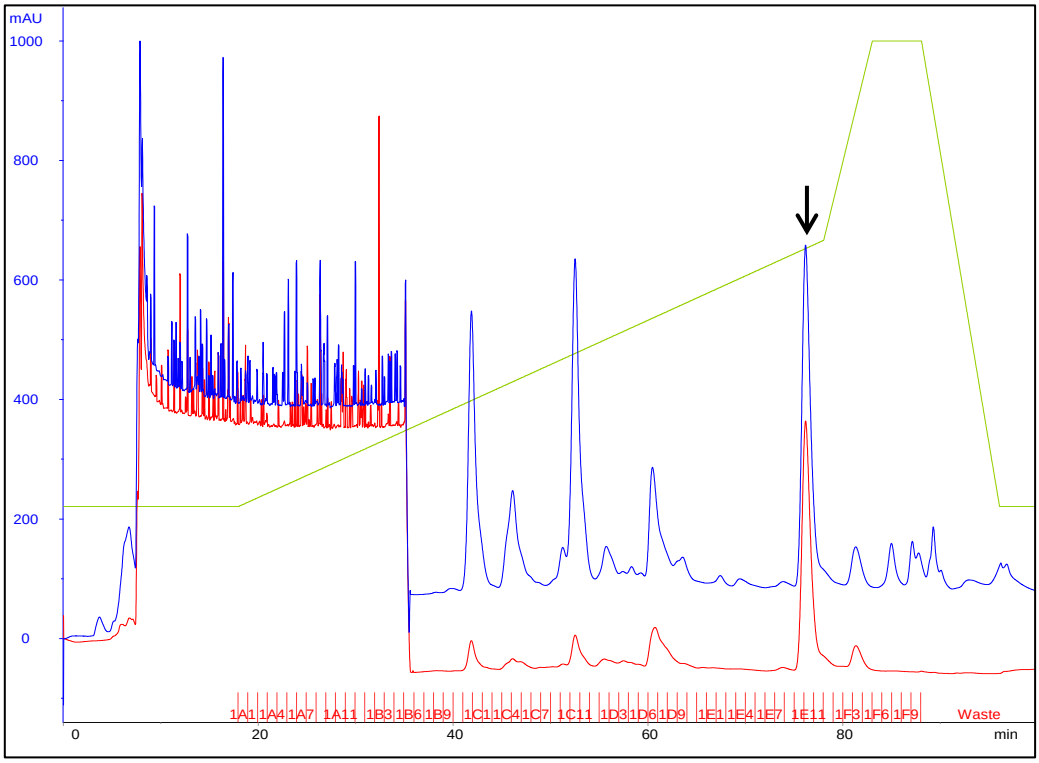
Doordat de onbekende AMC en *Bacillus* lipopeptiden vele eigenschappen delen zoals hoge pH resistentie, hittestabiliteit en proteolytische resistentie werd besloten dat het waarschijnlijk om een lipopeptide gaat (From et al., 2007). Daarom werd er gebruik gemaakt van technieken die specifiek zijn voor de opzuivering van lipopeptiden. Verschillende fractioneringsstappen werden achtereenvolgens uitgevoerd. Hierbij werd tussen elke stap de antibacteriële activiteit tegen *C. difficile* getest d.m.v. een agar well diffusietest en werd telkens met de actiefste fracties verder gewerkt.

3.2.1 *SOLID PHASE EXTRACTION* CHROMATOGRAFIE

Opgeconcentreerd BA SN werd als eerste op een SPE kolom gebracht en de bekomen fracties werden getest op activiteit (Tabel 7.2). De meest actieve fractie werd bekomen na wassen van de kolom met gedestilleerd water. De grootte van de inhibitiezone bedroeg 20 mm. Het staal werd verder opgezuiverd m.b.v. HPLC in het *Laboratory for Protein Biochemistry & Biomolecular Engineering* (L-ProBE)(Faculteit Wetenschappen, Ugent).

3.2.2 *HIGH PRESSURE LIQUID* CHROMATOGRAFIE

Er werden verschillende pieken gedetecteerd in het bekomen chromatogram (Figuur 3.8). Van alle HPLC fracties werd de antibacteriële activiteit gemeten. Hieruit blijkt dat de fracties E10, E11 en E12; die elueren tussen 75 en 78 min, het meest actief zijn tegen CDVPI met een inhibitiezone van respectievelijk 19, 26 en 24 mm (Tabel 7.2). De drie fracties werden gepoold en verder gekarakteriseerd m.b.v. HPLC-ESI MS aan de Vakgroep Veterinaire Volksgezondheid en Voedselveiligheid (Faculteit Diergeneeskunde, UGent)



Figuur 3.8 Chromatogram na HPLC opzuivering. Blauw, absorptie bij 220 nm; rood: absorptie bij 280 nm; groen, gradiënt buffersysteem; zwarte pijl, piek t.h.v. de meest actieve fracties (E10-E11-E12).

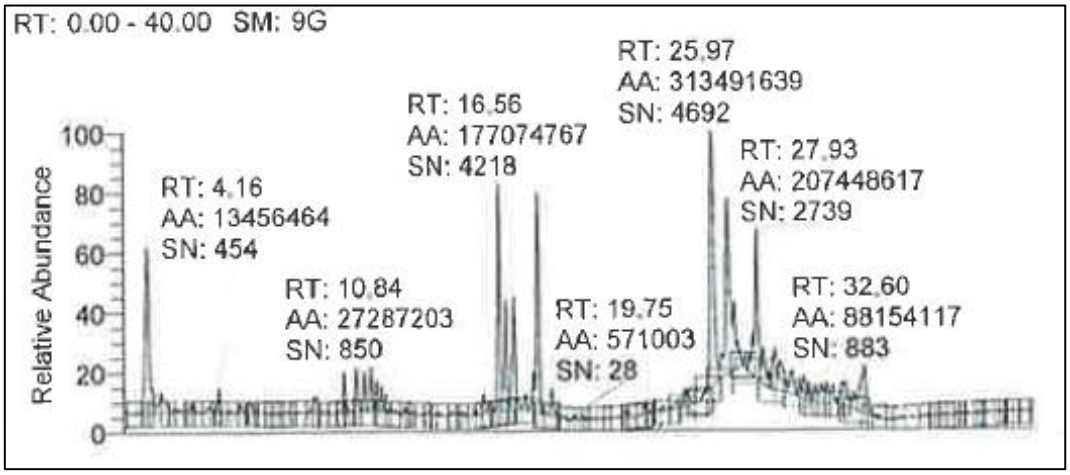
3.2.3 HPLC-ESI MASSASPECTROMETRIE

SURFACTINE

Eerst werd aangekocht surfactine bestudeerd met ESI MS. Surfactine is een commercieel verkrijgbaar lipopeptide van *B. amyloliquefaciens* dat antimicrobiële eigenschappen bevat (Alvarez et al., 2012; Hsieh et al., 2004). Figuur 7.1 geeft het massaspectrum van commercieel beschikbaar surfactine weer. Deze pieken komen overeen met typische pieken voor surfactine zoals beschreven in de literatuur (Tang et al., 2010).

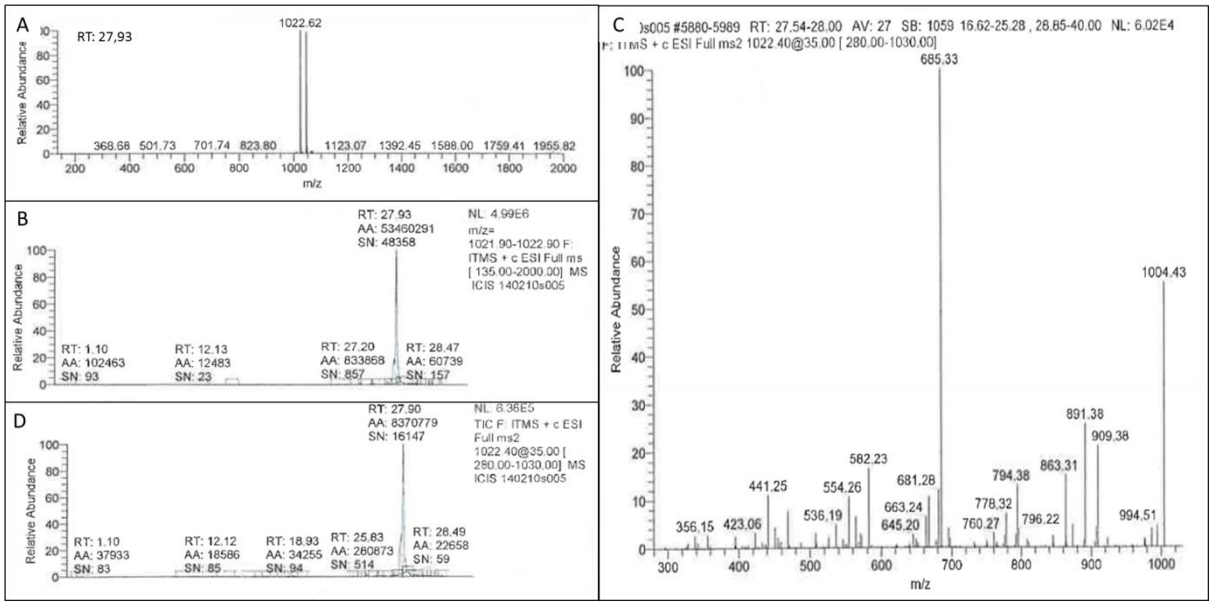
NIET-OPGEZUIVERD ACTIEF STAAL

Erna werd het niet-opgezuiverd actief staal gescheiden en bestudeerd m.b.v. HPLC-ESI massaspectrometrie. Verschillende pieken konden worden onderscheiden op het chromatogram (Figuur 3.9).



Figuur 3.9 Chromatogram van het niet-opgezuiverd actief staal. Relatieve abundantie en bijhorende retentietijd (in min) van het niet-opgezuiverd actief staal gescheiden op een C18 HPLC kolom.

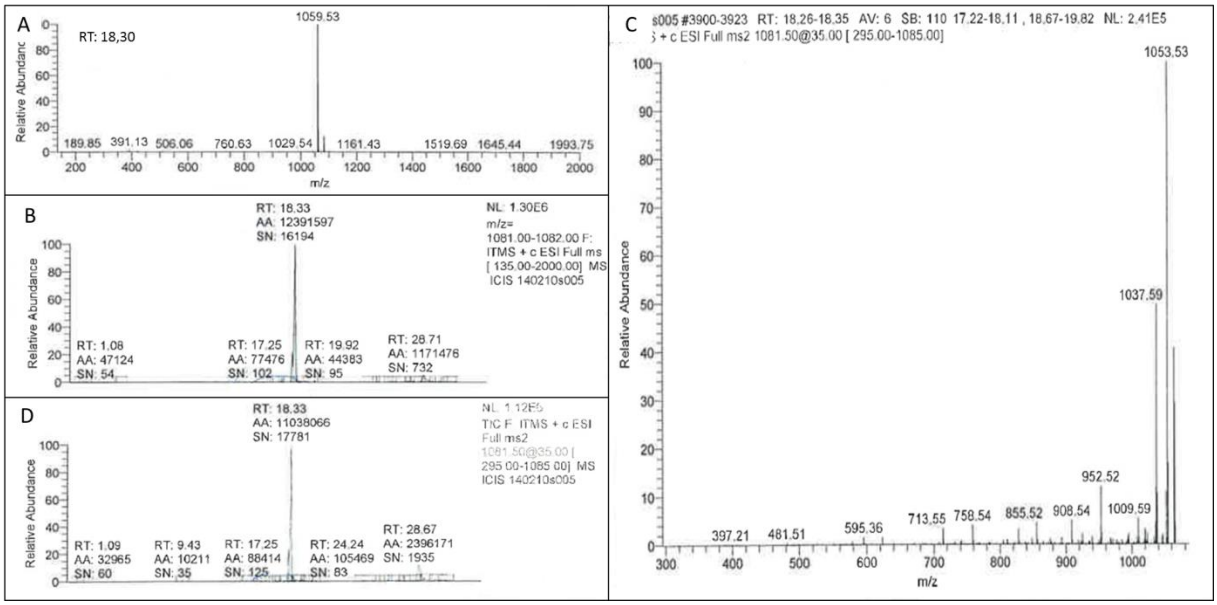
Vervolgens werd er ingezoomd in het massaspectrogram van het niet-opgezuiverd actief staal bij 1022 Da om de karakteristieke piek van surfactine te zoeken (Figuur 3.10 A). Deze piek bleek aanwezig te zijn en elueert na 27,93 min van de HLPC kolom (Figuur 3.10 B). Fragmentatie van deze piek (MS^2) gaf eenzelfde retentietijd en een dominante piek van 685,33 Da die overeenkomt met de preferentiële ringopening van surfactine t.h.v. een esterverbinding (Figuur 3.10 C en D)(Hue et al., 2001; Tang et al., 2010).



Figuur 3.10 Massaspectra en chromatogrammen van surfactine. A) MS spectrum ingezoomd op 1022 Da. **B)** Chromatogram van de MS piek bij 1022 Da. **C)** MS^2 spectrum bekomen door fragmentatie van de MS piek bij 1022 Da. **D)** Chromatogram van de MS^2 piek bij 1022 Da.

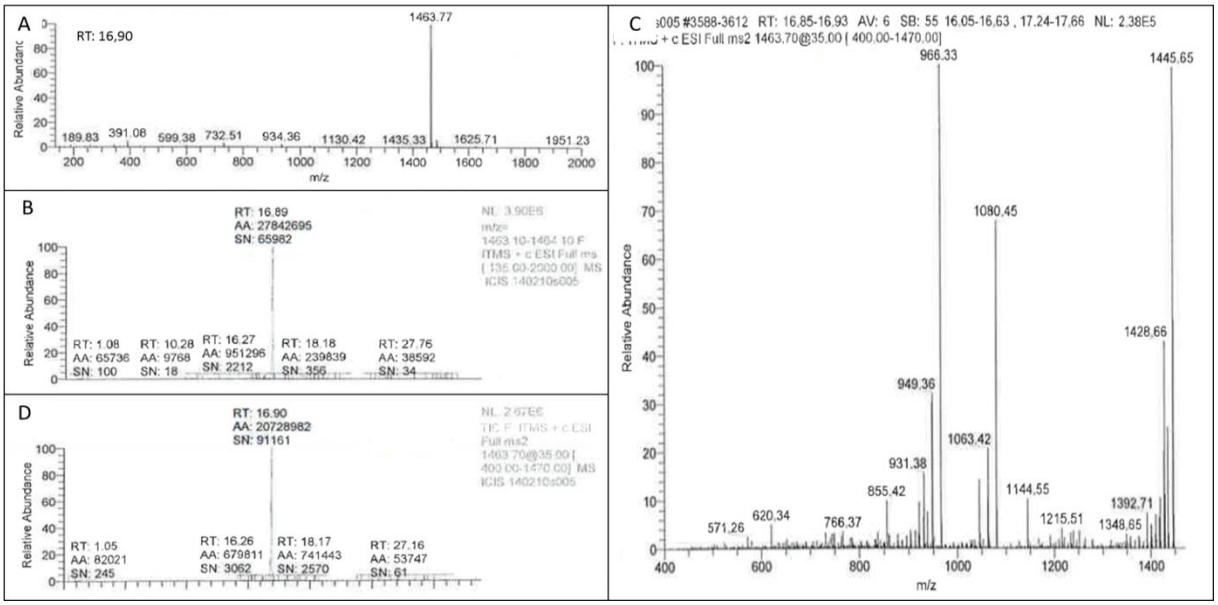
Naast surfactine werd de aanwezigheid van twee andere gekende lipopeptiden van *B. amyloliquefaciens* in het niet-opgezuiverd actief staal gecontroleerd.

Uit de literatuur blijken pieken van 1059,5 Da; 1081,5 Da en 1097,5 Da karakteristiek te zijn voor het BA lipopeptide bacillomycine gemeten in de positieve modus (Caldeira et al., 2011; Tanaka et al., 2014; Zhao et al., 2013). Om de aanwezigheid van bacillomycine te bestuderen werd in het MS spectrum ingezoomd bij 1081 Da (Figuur 3.11 A). Deze piek bleek aanwezig te zijn en elueert na 18,30 min van de HLPC kolom (Figuur 3.11 B). Daarna werd MS^2 uitgevoerd bij 1081 Da om te valideren dat deze piek weldegelijk bacillomycine voorstelt. De pieken bij 952 Da, 1037 Da en 1053 Da in het MS^2 spectrum komen overeen met de karakteristieke productionen van bacillomycine bekomen na fragmentatie (Figuur 3.11 C en D)(Tanaka et al., 2014).



Figuur 3.11 Massaspectra en chromatogrammen van bacillomycine. A) MS spectrum ingezoomd op 1081 Da. **B)** Chromatogram van de MS piek bij 1081 Da. **C)** MS^2 spectrum bekomen door fragmentatie van de MS piek bij 1081 Da. **D)** Chromatogram van de MS^2 piek bij 1081 Da.

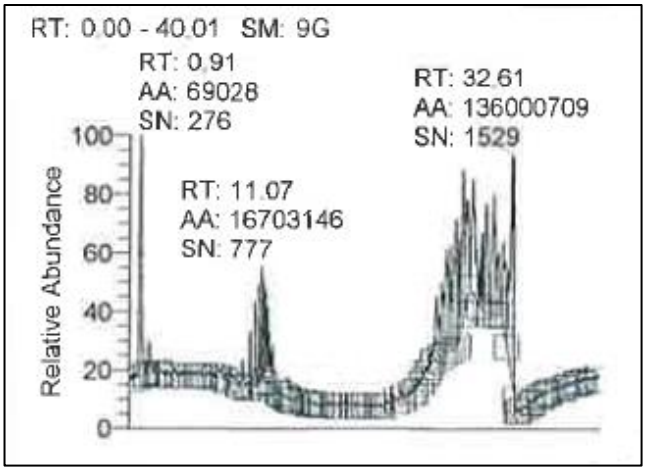
Een ander lipopeptide, fengycine genaamd, werd eveneens onderzocht. Uit de literatuur blijkt een piek bij 1463,70 Da in de positieve modus typisch voor fengycine (Zhao et al., 2013). Om de aanwezigheid van fengycine in het niet-opgezuiverd actief staal te controleren werd in het MS spectrum ingezoomd bij 1463 Da (Figuur 3.12 A). Deze piek werd gevonden en elueert na 16,90 min (Figuur 3.12 B). Daarna werd MS^2 uitgevoerd bij 1463 Da om te valideren dat deze piek weldegelijk fengycine voorstelt. De pieken bij 966 Da, 1080 Da en 1445 Da in het MS^2 spectrum komen overeen met de karakteristieke productionen van fengycine bekomen na fragmentatie (Figuur 3.12 C en D) (Zhao et al., 2013).



Figuur 3.12 Massaspectra en chromatogrammen van fengycine. A) MS spectrum ingezoomd op 1463 Da. **B)** Chromatogram van de MS piek bij 1463 Da. **C)** MS^2 spectrum bekomen door fragmentatie van de MS piek bij 1463 Da. **D)** Chromatogram van de MS^2 piek bij 1463 Da.

OPGEZUIVERD ACTIEF STAAL

Als laatste werd het opgezuiverd actief staal (gepoolde fracties E10-E11-E12) onderzocht met HPLC-ESI MS. Deze fracties elueerden van de HPLC kolom tussen 75 en 78 min (Figuur 3.8). Bij lading van het opgezuiverde staal op de HPLC-ESI kolom, werden in het chromatogram drie piekclusters gezien met bijhorende retentietijden van 0,91 min; 11,07 min en 32,61 min (Figuur 3.13).



Figuur 3.13 Chromatogram van het opgezuiverd actief staal. Relatieve abundantie en bijhorende retentietijd (in min) van de gepoolde fracties (E10-E11-E12) gescheiden op een C18 HPLC kolom.

De eerste piekcluster bevat geprotoneerd dioctyl phthalaat, een contaminant (Figuur 7.2 A)(Arakawa et al., 2004). In de tweede piekcluster werden verschillende pieken met een onderlinge afstand van 44 Da teruggevonden (Figuur 7.2 B). Dit patroon is typisch voor een contaminatie van polyethyleenglycol (PEG)(Varray et al., 2000). De derde piekcluster kon niet worden gedefinieerd (Figuur 7.2 C).

3.3 SELECTIVITEIT AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

Om de selectiviteit van de onbekende AMC in kaart te brengen, werd de antimicrobiële activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans getest tegen een selectie aerobe en anaerobe bacteriële isolaten (Tabel 7.3). De aerobe soorten werden geïsoleerd en geïdentificeerd tijdens de bacteriële diagnostiek van de vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten (Faculteit Diergeneeskunde, Ugent) en zijn afkomstig van zieke of dode dieren.

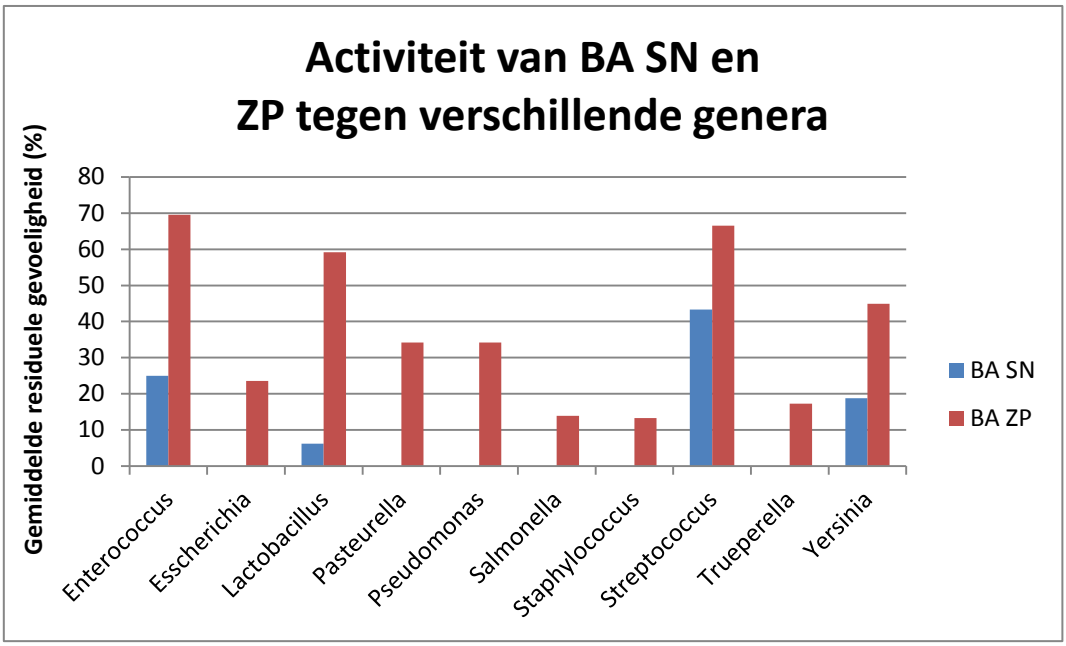
Verschillende bacteriën zijn onderhevig aan de antibacteriële werking van de AMC van *B. amyloliquefaciens* (Tabel 3.1). De gemiddelde residuele activiteit van elk isolaat is weergegeven in vergelijking met de gemiddelde activiteit van BA SN of BA ZP tegen CDVPI (in percentage)(Tabel 3.1). Van sommige *Trueperella* en *Lactobacillus* isolaten kon geen data weergegeven worden door een gebrekkige groei of t.g.v. contaminatie (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Lijst van bacteriële isolaten en hun gevoeligheid aan *B. amyloliquefaciens* supernatans. Opsomming van aerobe en anaerobe bacteriële isolaten waartegen de antimicrobiële activiteit van BA supernatans getest werd. "Nr.", nummer; "Naam", naam van genus, species, eventueel subspecies en nummer uit de collectie van de dierenkliniek van vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten (Faculteit Diergeneeskunde, Ugent); "Residuele activiteit (%)", gemiddelde residuele activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans ("BA SN") en van vijftig maal opgeconcentreerde *B. amyloliquefaciens* supernatans ("BA ZP") in percentage; "-": geen data beschikbaar door gebrek aan bacteriële groei of t.g.v. contaminatie.

Nr.	Naam	Residuele activiteit (%)	
	Aerobe stammen	BA SN	BA ZP
1	DNAse negatieve *Staphylococcus* sp. 9970	0	7,9
2	DNAse negatieve *Staphylococcus* sp. 9974	0	0
3	*Enterococcus cecorum* 10036	25,0	69,5
4	*Esscherichia coli* 9975	0	22,9
5	*Esscherichia coli* 9978	0	14,3
6	*Esscherichia coli* 10025	0	42,9
7	*Esscherichia coli* 10046	0	20,0
8	*Esscherichia coli* 10049	0	21,4
9	*Esscherichia coli* 10060	0	20,0
10	*Pasteurella* sp.	0	31,6
11	*Pasteurella* sp.	0	36,8
12	*Pseudomonas aeruginosa* 10003	0	15,7
13	*Pseudomonas aeruginosa* 10025	0	0
14	*Salmonella enteritidis* sp.	0	14,3
15	*Salmonella typhimrium* sp.	0	14,3
16	*Salmonella* sp. 10005	0	11,4
17	*Salmonella* sp. 10015	0	15,7
18	*Staphylococcus aureus* 10036	0	11,4
19	*Staphylococcus aureus* 10057 (MRSA)	0	11,4
20	*Staphylococcus intermedius* sp.	0	17,1
21	*Staphylococcus intermedius* 9970	0	22,2
22	*Staphylococcus intermedius* 9995	0	14,3
23	*Staphylococcus intermedius* 10050	0	22,2

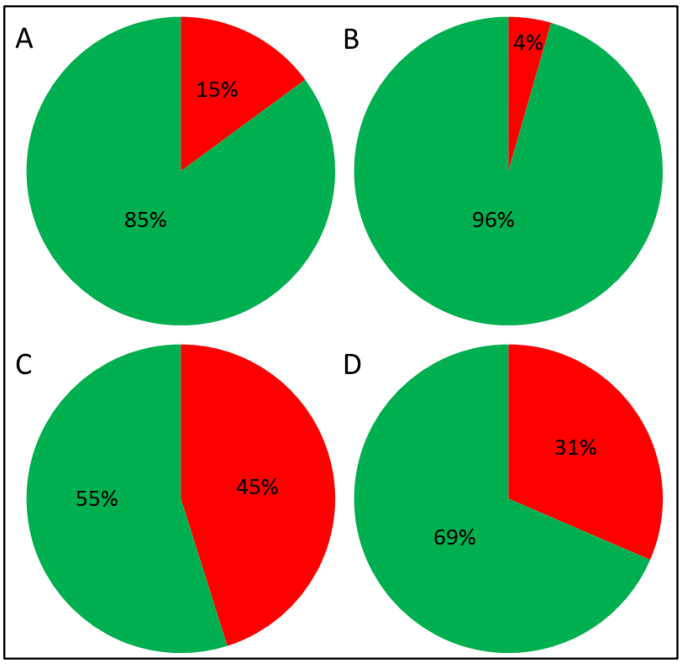
24	*Staphylococcus intermedius* 10052	0	13,2
25	*Streptococcus bovis* 10091	0	42,9
26	*Streptococcus equi* subsp. *equi* 9969	50,0	89,5
27	*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* 9999	50,0	60,6
28	*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* 10038	50,0	74,3
29	*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* 10072	66,7	65,1
30	*Trueperella pyogenes* 9950	-	-
31	*Trueperella pyogenes* 9972	-	30,3
32	*Trueperella pyogenes* 10048	0	0
33	*Trueperella pyogenes* 10078	0	21,4
34	*Yersinia pseudotuberculosis* 10103	14,6	37,7
35	*Yersinia pseudotuberculosis* 10105	22,9	52,2
	Anaerobe stammen		
36	*Lactobacillus acidophilus* sp.	0	60,0
37	*Lactobacillus bifermentans* sp.	-	-
38	*Lactobacillus brevis* sp.	0	88,6
39	*Lactobacillus buchneri* sp.	0	51,4
40	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*	-	-
41	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis*	-	-
42	*Lactobacillus fructivorans* sp.	-	-
43	*Lactobacillus gasseri* sp.	-	-
44	*Lactobacillus helveticus* sp.	-	-
45	*Lactobacillus intestinalis* sp.	-	-
46	*Lactobacillus johnsonni* sp.	-	-
47	*Lactobacillus paracasei* sp.	0	0
48	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	0	85,7
49	*Lactobacillus plantarum* sp.	50,0	55,7
50	*Lactobacillus rhamnosus* sp.	-	60,0
51	*Lactobacillus sake carnosus* sp.	0	57,1
52	*Lactobacillus salivarius* sp.	0	74,3

Enterococcus, *Lactobacillus*, *Streptococcus* en *Yersinia* species blijken gevoelig te zijn aan het BA SN (Figuur 3.14). *Esscherichia*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Salmonella* en *Staphylococcus* en *Trueperella* species daarentegen blijken ongevoelig te zijn aan het BA SN maar wel aan het 50 maal opgeconcentreerde supernatans (Figuur 3.14). Sommige soorten zijn dus gevoelig aan de AMC maar in mindere mate dan tegen *C. difficile*.



Figuur 3.14 Activiteit van BA SN en ZP tegen verschillende genera. De gemiddelde residuele gevoeligheid van verschillende genera aan BA SN en ZP is weergegeven. "BA SN", gemiddelde activiteit van *B. amyloliquefaciens* supernatans (in %); "BA ZP", gemiddelde activiteit van vijftig maal opgeconcentreerde *B. amyloliquefaciens* supernatans (in %).

Als gekeken wordt naar de verhouding Gram-positieve versus Gram-negatieve species, ligt de gevoeligheid aan BA SN en ZP hoger bij Gram-positieve species (Figuur 3.15). BA SN inhibeert 15,0% van de geteste Gram-positieve bacteriën en 4,5% van de geteste Gram-negatieve bacteriën (Figuur 3.15 A en B). Bij BA ZP ligt de gemiddelde residuele gevoeligheid globaal veel hoger, namelijk 45,1% bij Gram-positieve bacteriën en 31,5% bij Gram-negatieve bacteriën (Figuur 3.15 C en D).



Figuur 3.15 Activiteit van BA SN en ZP tegen Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën. Gemiddelde residuele gevoeligheid aan BA SN van Gram-positieve bacteriën (A) en Gram-negatieve bacteriën (B). Gemiddelde residuele gevoeligheid aan BA ZP van Gram-positieve bacteriën (C) en Gram-negatieve bacteriën (D). Rood, isolaten gevoelig aan de AMC; groen, isolaten resistent tegen de AMC.

3.4 ANTIBACTERIËLE ACTIVITEIT VAN *C. PERFRINGENS*

3.4.1 OPTIMALISATIE

Om na te gaan in welke omstandigheden het supernatans van CP38 de sterkste antibacteriële activiteit vertoont tegen *C. difficile*, werd de keuze van media en de opconcentratiemethode van CP SN bestudeerd m.b.v. een agar well diffusietest (Tabel 7.4).

MEDIA

De antibacteriële activiteit van CP SN werd vergeleken tussen het CDB en BHI medium; waarna de eiwitsamenstelling van het CDB aangepast werd om een vlottere opconcentratie met de vivaspin te bekomen.

CP SN afkomstig van CP38 opgegroeid in CDB1 en CDB2 heeft een *activity unit* (AU) van 4 (Tabel 3.2). Bij groei van CP38 in CDB3 werd er iets minder antibacteriële activiteit waargenomen, namelijk een AU van 2 (Tabel 3.2). De media BHI, CDB4 en CDB5 vertonen geen antibacteriële activiteit t.o.v. CDVPI (Tabel 3.2).

De groei van CP38 werd tevens gecontroleerd m.b.v. een titratietest. De media BHI, CDB1, CDB2 en CDB3 geven aanleiding tot een sterke groei van CP38 (~$3*10^9$ kolonies/ml)(Tabel 3.2). In het medium CDB4 groeit CP38 net iets minder, namelijk $1,7*10^8$ kolonies/ml; en in het medium CDB5 werden er slechts $1,2*10^4$ kolonies/ml geteld (Tabel 3.2).

Tabel 3.2 Antibacteriële activiteit en groei van CP38 in verschillende media. De antibacteriële activiteit van CP SN werd getest tegen CDVPI m.b.v. een agar well diffusietest. Het aantal kolonies/ml werden berekend van CP38 a.d.h.v. een titratietest. "Medium", het gebruikte medium; "AU", *activity unit* van CP SN; "Kolonies/ml", aantal CP38 kolonies aanwezig per ml.

Medium	AU	Kolonies/ml
BHI	0	$1,5.*10^9$
CDB1	4	$3,2*10^9$
CDB2	4	$3,3*10^9$
CDB3	2	$1,6*10^9$
CDB4	0	$1,7*10^8$
CDB5	0	$1,2*10^4$

VIVASPIN VS. AMMONIUMSULFAATPRECIPITATIE

De manier waarop CP SN wordt opgeconcentreerd, kan tevens een invloed hebben op de sterkte van de antibacteriële activiteit tegen *C. difficile*. Daarom werd de activiteit van CP SN vergeleken na opconcentratie door twee verschillende technieken. De twee technieken zijn enerzijds ultrafiltratie gebruikmakende van een vivaspin; en anderzijds precipitatie m.b.v. ammoniumsulfaat. Bij het gebruik van de vivaspin werd een inhibitiezone van 13 mm tegen CDVPI gemeten wanneer CP SN 10 maal opgeconcentreerd is. Na ammoniumsulfaatprecipitatie werd een inhibitiezone van 10 mm tegen CDVPI gemeten na 50 maal opgeconcentratie van CP SN. Doordat CP SN een sterkere antibacteriële activiteit vertoont bij de vivaspin en er minder opgeconcentreerd moet worden; gaat de voorkeur uit naar deze techniek.

3.4.2 OPZUIVERING AMC VAN CP SN

Supernatans van CP38, opgegroeid in CDB2 en opgeconcentreerd m.b.v. een vivaspin, werd gescheiden m.b.v. IEC. Eerst werd scheiding van de AMC uitgevoerd d.m.v. anion-uitwisselingschromatografie. De sterkste antibacteriële activiteit (10 mm inhibitiezone tegen CDVPI) werd gevonden in de doorloop van CP SN op de kolom; en na eenmaal te wassen met 10 mM Tris-buffer bij pH 8,5 (Tabel 7.4).

Vervolgens werd de actieve doorloop, afkomstig van de anion-uitwisselingschromatografie, verder gescheiden m.b.v. kation-uitwisselingschromatografie. Hieruit blijken de doorloop, was 1, was 2, staal 0, staal 1 en staal 2 actief te zijn. De antibacteriële activiteit in de opgevangen stalen bleek groter te zijn dan dat van het startstaal (12 mm inhibitiezone bij doorloop, was 1, was 2 en staal 0 tegen CDVPI in vergelijking met 10 mm voor het startstaal) (Tabel 7.4).

3.5 BEPALING VAN TOXINEGENEN VAN *C. DIFFICILE* STAMMEN

3.5.1 OPTIMALISATIE VAN PCR

Voor de bepaling van de aanwezigheid van toxinegenen *tcdA* en *tcdB* werden vier verschillende combinaties van primerconcentratie getest. Een concentratie van 0,15 µM voor tcdA F en tcdA R en 0,25 µM voor tcdB F, tcdB R, tpi F en tpi R gaf het beste resultaat (Figuur 7.3).

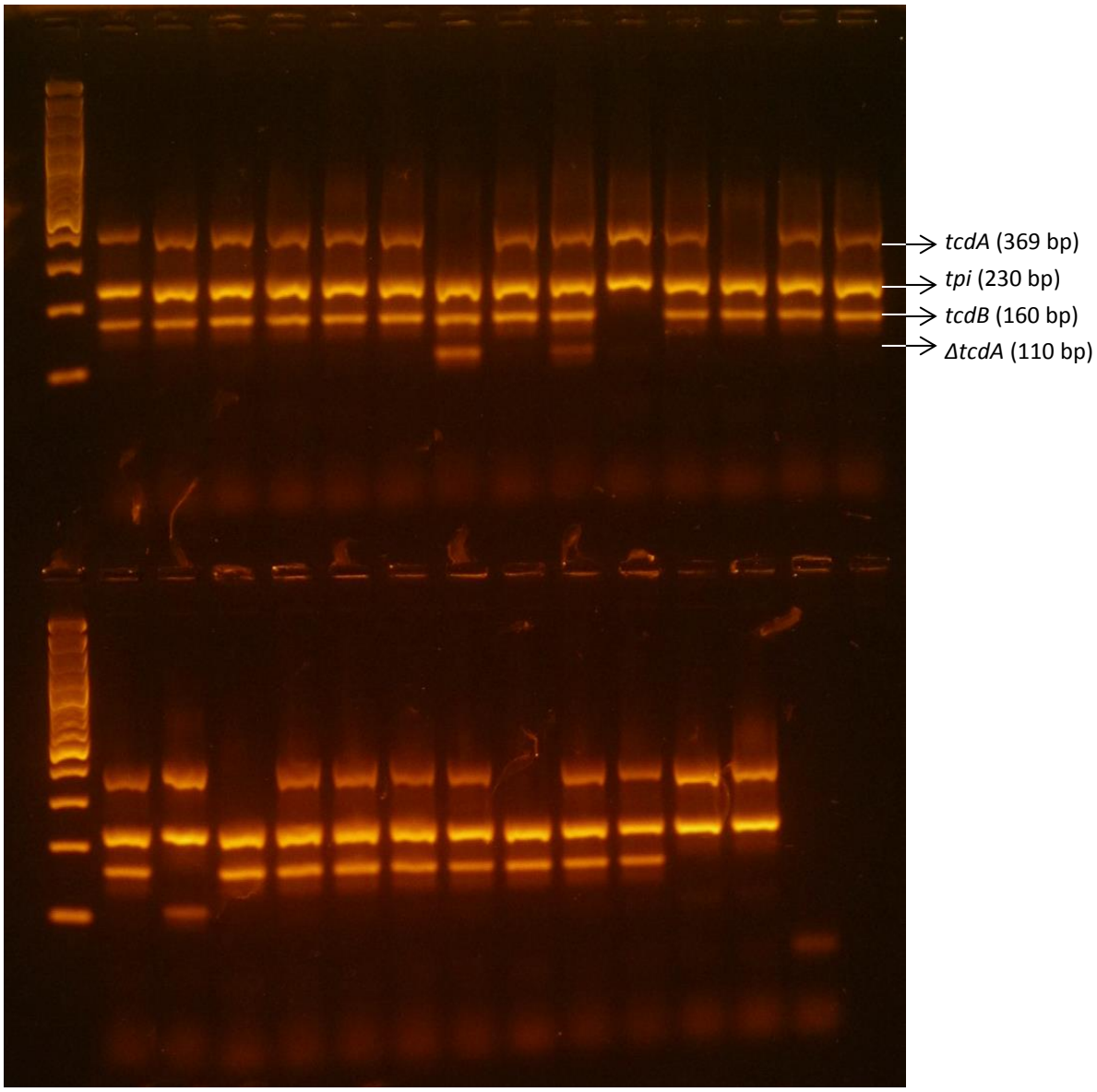
Vervolgens werd gekeken of het toevoegen van 50% glycerol een positieve invloed heeft op de reacties. Daaruit blijkt dat glycerol net een negatief effect geeft op de PCR (Figuur 7.3). Als laatst werd gekeken bij welke verdunning geëxtraheerd DNA (10x of 100x verdunning in RNAse vrij water) de PCR het beste resultaat gaf. Hier blijkt het verschil niet zo groot te zijn, toch werd er geopteerd voor een tienmaal verdunning omdat de bandjes meer helder waren (Figuur 7.3).

Voor de bepaling van de binaire toxinegenen werden er minder parameters geoptimaliseerd, enkel de concentratie het DNA in de PCR mix diende verhoogd te worden (van 1,5 µl naar 3 µl) voor een beter resultaat te verkrijgen.

3.5.2 AANWEZIGHEID VAN TOXINE A EN TOXINE B GENEN

In de eerste multiplex reactie werd de aanwezigheid van *C. difficile* toxinegenen *tcdA* en/of *tcdB* getest (A^+B^+, A^-B^+, A^+B^- of A^-B^-). Tevens werd de aanwezigheid van het huishoudgen *tpi,* coderend voor triose fosfaat isomerase (Tpi), als positieve controle getest (Figuur 7.4).

De meeste *C. difficile* stammen hebben beide toxine A en toxine B genen (Figuur 3.16). BR017 en BR126 bevatten het toxine B gen en een verkort fragment van het toxine A gen (Figuur 3.16). BR046 vertoont geen bandje ter hoogte van het tcdA geamplificeerd fragment, noch t.h.v. het gedeleteerde tcdA fragment (Figuur 3.16). BR023 en BR075 vertonen een bandje bij beide tcdA fragmenten (tcdA en ΔtcdA)(Figuur 3.16). BR027, BR075, CD1067 en CD1165 ontbreken toxine B (Figuur 3.16).

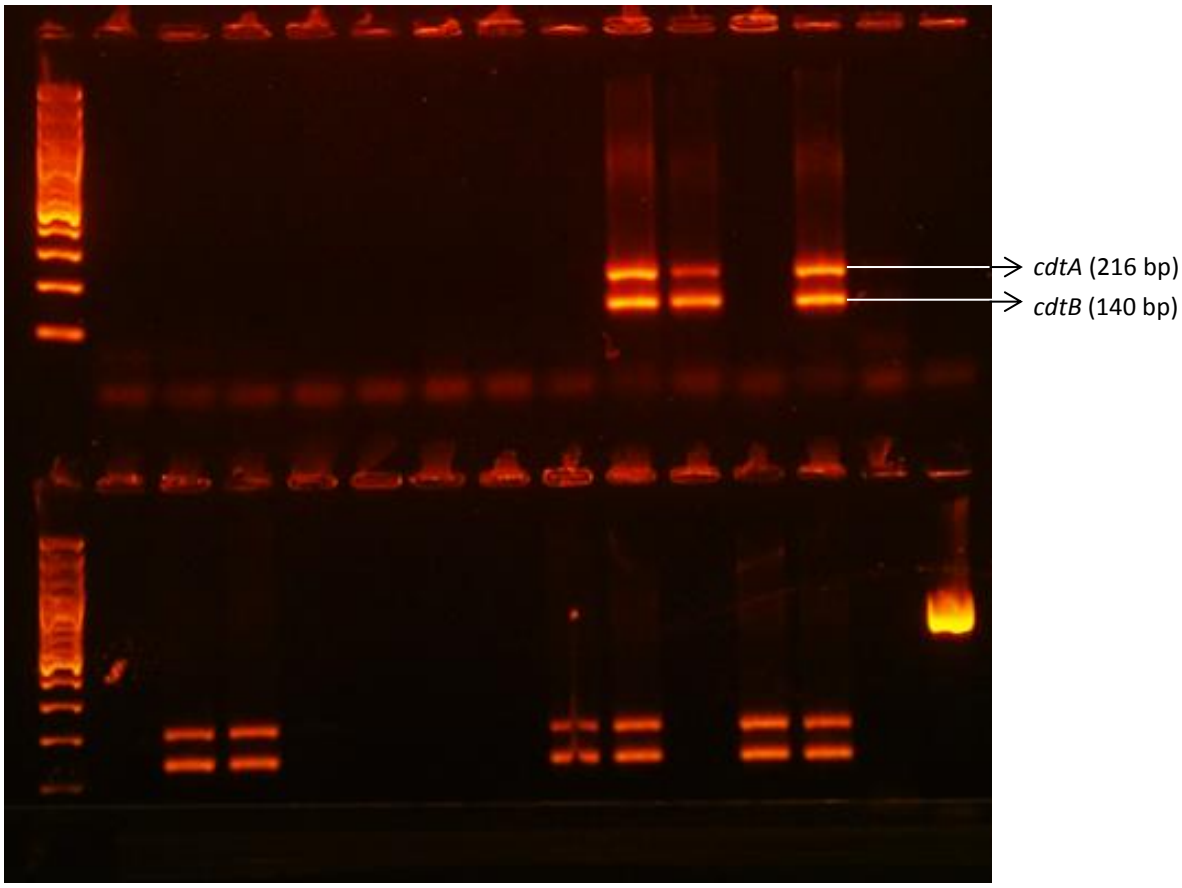


Figuur 3.16 Gelelektroforese van multiplex PCR met tcdA, tcdB en tpi primers. Van 26 *C. difficile* stammen werden de toxinegenen bepaald m.b.v. amplificatie met tcdA en tcdB primers. Tevens werd de aanwezigheid van het huishoudgen *tpi* bepaald. Gel boven: 1^{e} laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 15, *C. difficile* ribotypes BR001, BR002, BR003, BR012, BR014, BR015, BR017, BR020, BR023, BR027, BR029, BR046, BR053, BR056. Gel beneden: 1^{e} laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 14, *C. difficile* ribotypes, BR070, BR075, BR078, BR081, BR087, BR095, BR106, BR126, BR131, CDVPI, CD1067, CD1165, negatieve controle. "*tcdA*", niet gedeleteerd fragment van het toxine A gen; "*tpi*", fragment van het *tpi* gen; "*tcdB*", fragment van het toxine B gen; "*ΔtcdA*", gedeleteerd fragment van het toxine A gen.

3.5.3 AANWEZIGHEID VAN BINAIRE TOXINEGENEN

In de tweede multiplexreactie werd de aanwezigheid van binaire toxinegenen getest door primers te gebruiken die selectief met *cdtA* en *cdtB* interageren (Figuur 7.5).

Niet elke *C. difficile* stam blijkt de binaire toxinegenen te bevatten (Figuur 3.17). De *C. difficile* stammen die de binaire toxinegenen bevatten zijn BR023, BR027, BR046, BR075, BR078, BR126, BR131, CD1067 en CD1165 (Figuur 3.17).



Figuur 3.17 Gelelektroforese van multiplex PCR met cdtA en cdtB primers. Van 26 *C. difficile* stammen werden de toxinegenen bepaald m.b.v. amplificatie met cdtA en cdtB primers. Gel boven: 1e laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 15, *C. difficile* ribotypes BR001, BR002, BR003, BR012, BR014, BR015, BR017, BR020, BR023, BR027, BR029, BR046, BR053, BR056. Gel beneden: 1e laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 14, *C. difficile* ribotypes, BR070, BR075, BR078, BR081, BR087, BR095, BR106, BR126, BR131, CDVPI, CD1067, CD1165, negatieve controle; laan 15, niet bij het experiment horend staal. "*cdtA*" en "*cdtB*", fragmenten van de binaire toxinegenen.

Een overzicht van alle toxinegenen is weergegeven in Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Overzicht van *C. difficile* ribotypes en aanwezige toxinegenen. "Nr.", nummer; "*C. difficile* ribotype", zessentwintig geteste *C. difficile* ribotypes. De eerste 23 ribotypes zijn de meest voorkomende ribotypes afkomstig van het referentielaboratorium UCL (BR001 – BR131). CDVPI is de typestam van *C. difficile*. CD1067 en CD1165 zijn twee isolaten afkomstig van het referentielaboratorium UCL. "*C. difficile* toxinegen", aanwezigheid van *tcdA*, *tcdB* en *cdtA/cdtB* genen coderend voor "Toxine A", "Toxine B" en het "Binair toxine". Bij aan- of afwezigheid wordt een "+" of "-" genoteerd.

		C. difficile toxinegen		
Nr.	*C. difficile* ribotype	Toxine A	Toxine B	Binair toxine
1	BR001	+	+	-
2	BR002	+	+	-
3	BR003	+	+	-
4	BR012	+	+	-
5	BR014	+	+	-
6	BR015	+	+	-
7	BR017	-	+	-
8	BR020	+	+	-
9	BR023	+	+	+
10	BR027	+	-	+
11	BR029	+	+	-
12	BR046	-	+	+
13	BR053	+	+	-
14	BR056	+	+	-
15	BR070	+	+	-
16	BR075	+	-	+
17	BR078	-	+	+
18	BR081	+	+	-
19	BR087	+	+	-
20	BR095	+	+	-
21	BR106	+	+	-
22	BR126	-	+	+
23	BR131	+	+	+
24	CDVPI	+	+	-
25	CD1067	+	-	+
26	CD1165	+	-	+

4. DISCUSSIE

4.1 KARAKTERISATIE AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

4.1.1 MAXIMALE PRODUCTIE AMC

Met behulp van een *B. amyloliquefaciens* groeicurve werd nagegaan welke groeifase geassocieerd is met de productie van de antimicrobiële activiteit. Uit de resultaten is gebleken dat *B. amyloliquefaciens* eerst tot de stationaire fase groeit; en vervolgens de antimicrobiële component begint te produceren. Dit wil zeggen dat deze componenten niet essentieel zijn voor de groei van de bacterie en bijgevolg secundaire metabolieten zijn. Deze metabolieten worden geproduceerd als antwoord op een groeibeperking door de uitputting van essentiële nutriënten. Deze antimicrobiële productie levert de bacterie een selectief voordeel op voor overleving door andere bacteriën te inhiberen (Carvalho et al., 2010).

4.1.2 INVLOED VAN PH, TEMPERATUUR EN PROTEASEN

De onbekende AMC blijkt stabiel te zijn bij een neutrale en hoge pH. Bij een lage pH (pH <5) slaat de AMC neer waardoor het zijn activiteit verliest. Indien de AMC terug opgelost wordt in een buffer met een neutrale pH, kan de antimicrobiële activiteit tegen *C. difficile* worden hersteld.

Daarnaast is de AMC hittestabiel bij een korte incubatie periode (10 min) tot op een temperatuur van 100°C. Bij een hogere temperatuur begint de AMC zijn antibacteriële activiteit te verliezen ten gevolge van denaturatie.

De AMC is tevens resistent aan de proteaseactiviteit van pepsine, proteinase P, proteinase K, trypsine en pronase na een lange incubatieperiodes (24 uur); en resistent tegen chymotrypsine gedurende een korte incubatieperiode (1 uur). De voornaamste knipplaatsen van chymotrypsine zijn C-terminaal op tryptofaan, trypsine, fenylanaline, leucine en methionine (Appel, 1986). De gevoeligheid aan chymotrypsine bij 24 u kan erop wijzen dat de AMC een proteïneachtige structuur bevat. De knipplaatsen van chymotrypsine bij 1 u incubatie, en van de andere proteasen zijn mogelijks beschermd door een compacte eiwitopvouwing of door een afschermende groep verbonden aan het peptide; of worden niet herkend door een modificatie van de aminozuurresiduen.

De hittestabiliteit, het verlies aan activiteit bij een lage pH en proteaseresistentie is typisch voor lipopeptiden (Akpa et al., 2001; Gu et al., 2005). Door verdere opzuivering werd getracht het onbekende lipopeptide te identificeren.

4.1.3 EFFECT VAN BA SN OP DARMCELLEN *IN VITRO*

Het cytotoxisch effect van *B. amyloliquefaciens* supernatans en opgeconcentreerd supernatans op Caco-2 cellen werd bepaald om na te gaan of deze stam gebruikt kan worden in een *in vivo* model. Aangezien een *C. difficile* infectie zich situeert in de darm werd gekozen voor de humane epitheliale colorectale adenocarcinoomcellijn Caco-2. Niet

opgeconcentreerd supernatans blijkt geen cytotoxisch effect te hebben op Caco-2 cellen. Opgeconcentreerd supernatans blijkt echter wel cytotoxisch te zijn en bevat bijgevolg componenten die bij een hogere concentratie een negatief effect hebben op de overleving van Caco-2 cellen. Er kan momenteel niet aangetoond worden dat dit toxisch effect wordt veroorzaakt door de antimicrobiële component actief tegen *C. difficile*. *Bacillus* species produceren onder andere diverse lipopeptiden waarvan het cytotoxisch effect reeds is aangetoond (Madslien et al., 2013). Het is dus mogelijk dat deze waargenomen cytotoxiciteit wordt veroorzaakt door de productie van andere lipopeptiden. Door verdere opzuivering van de antimicrobiële component en een nieuwe cytoxiciteitstest kan nagaan worden of deze component tevens een toxisch effect heeft op Caco-2 cellen.

4.2 OPZUIVERING AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

Voor de opzuivering van de antimicrobiële component werden technieken gebruikt specifiek voor de identificatie van lipopeptiden. Elektrospray ionisatie massaspectrometrie van een niet-opgezuiverd staal toonde aan dat *B. amyloliquefaciens* ook de lipopeptiden surfactine, bacillomycine en fengycine produceert. Massaspectrometrische analyse toonde echter aan dat geen van deze pieken kon worden teruggevonden in de opgezuiverde fractie. Bijgevolg wordt de antibacteriële activiteit tegen *C. difficile* niet veroorzaakt door het gekende surfactine, bacillomycine en fengycine. Verdere analyses zijn nodig om de identiteit van deze onbekende component te bepalen.

4.3 SELECTIVITEIT AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

Om een idee te krijgen van het activiteitspectrum van de antimicrobiële component werd het supernatans van *B. amyloliquefaciens* getest tegen een reeks van verschillende bacteriële soorten. Er werd weinig inhiberende activiteit vastgesteld tegen een selectie *Lactobacillus* species. Aangezien deze een onderdeel vormen van de normale darmflora zal deze bacteriële populatie weinig worden verstoord bij een eventueel therapeutisch gebruik van deze *Bacillus* stam (Walter, 2008). Het supernatans was ook beperkt actief tegen een aantal andere pathogene bacteriën zoals *Streptococcus equi* en *Yersinia pseudotuberculosis* (Waller et al., 2011; Galindo et al., 2011). Hoewel de antibacteriële activiteit niet uitsluitend werkzaam is tegen *C. difficile*, heeft het toch duidelijk een nauwer activiteitspectrum dan de huidige gebruikte breedspectrumantibiotica vancomycine en metronidazol (Freeman et al., 1997).

Daarnaast zijn Gram-positieve bacteriën gevoeliger aan de AMC dan Gram-negatieve bacteriën. *B. amyloliquefaciens,* zelf een Gram-positieve bacterie, inhibeert mogelijks de groei van dicht gerelateerde bacteriën makkelijker.

Het activiteitspectrum van *B. amyloliquefaciens* is, net als de waargenomen cytotoxiciteit bij Caco-2 cellen, mogelijks te wijten aan andere componenten aanwezig in het supernatans. Door hetzelfde experiment uit te voeren met een opgezuiverde antimicrobiële component kan nagaan worden of deze component al dan niet een nauwspectrumactiviteit tegen *C. difficile* stammen vertoont. Indien wel, kan de opgezuiverde component gebruikt worden als therapeutisch middel tegen *C. difficile* infecties zonder verstoring van de darmflora. Indien niet, kan het gebrek aan een nauwspectrumactiviteit gecompenseerd worden door de sterke activiteit van de antimicrobiële component tegen *C. difficile*. Door de component in een lage

dosis toe te voegen, worden selectief *C. difficile* cellen vernietigd en blijven andere bacteriën onaangetast.

Om het activiteitspectrum van de antimicrobiële component beter op te volgen in de toekomst, wordt de opgezuiverde component best toegevoegd aan een consortium van verschillende darmbacteriën, i.p.v. aan elke soort apart. Zo kan de dynamica van de antimicrobiële component op de microflora in een fermentor worden nagebootst. Het herstel van de bacteriële flora kan tevens worden opgevolgd na toediening van breedspectrumantibiotica.

4.4 ANTIBACTERIËLE ACTIVITEIT VAN *C. PERFRINGENS*

4.4.1 OPTIMALISATIE

Voor de productie van de onbekende antimicrobiële component van de *C. perfringens* stam 38 wordt ideaal gebruik gemaakt van CDB medium met 30 – 40 g/l proteose pepton. Bij een te lage concentratie aan proteose pepton, krijgt de bacterie niet genoeg essentiële nutriënten; bij een te hoge concentratie proteose pepton wordt de opconcentratie m.b.v. ultrafiltratie bemoeilijkt.

Aangezien het supernatans van *C. perfringens* op zich geen antibacteriële activiteit vertoont, is opconcentratie van het supernatans noodzakelijk om de antibacteriële activiteit te bepalen. De methode van opconcentratie heeft een invloed op de activiteit van de antimicrobiële component. Zo ligt de antibacteriële activiteit van de antibacteriële component lager na ammoniumsulfaatprecipitatie. Een mogelijke verklaring hiervoor is denaturatie tijdens de uitzouting (Wingfield, 2001).

4.4.2 OPZUIVERING AMC VAN CP SN

Voor de opzuivering van de antimicrobiële component werd achtereenvolgens gebruik gemaakt van anion- en kation-uitwisselingschromatografie met een Tris-buffer bij pH 8,5. Doordat de antimicrobiële component aan geen van beide kolommen bindt in de beginconditie, is de onbekende component waarschijnlijk netto ongeladen bij pH 8,5. Als controle hiervoor wordt *C. perfringens* supernatans best opnieuw opgezuiverd met ion-uitwisselingschromatografie bij een andere pH; of met behulp van hydrofobe interactie chromatografie. Na de scheiding van de antimicrobiële component, kan de identificatie ervan plaatsvinden m.b.v. massaspectrometrie.

4.5 BEPALING VAN TOXINEGENEN VAN *C. DIFFICILE* STAMMEN

4.5.1 OPTIMALISATIE VAN PCR

Er wordt gebruik gemaakt van meerdere primerparen met een verschillend smeltpunt. Om de meest optimale condities te vinden werd de PCR eerst geoptimaliseerd.

Het gebruik van glycerol verhoogt normaalgezien de efficiëntie en specificiteit van de amplificatie reactie (Cheng et al., 1995; Lu et al., 1993). Daarnaast helpt glycerol het DNA-polymerase te stabiliseren (Cheng et al., 1995). Toevoeging van glycerol had in deze multiplex PCR echter een nadelig effect op de amplificatie. Dit kan mogelijks verklaard

worden doordat deze effecten werden bestudeerd bij organismen waarvan het genetisch materiaal een hoge GC inhoud bevat terwijl *C. difficile* slechts een GC inhoud heeft van 28% (Mammedov et al., 2008).

4.5.2 Aanwezigheid van toxine A en toxine B genen

De meeste *C. difficile* stammen hebben zowel het toxine A als het toxine B gen. De stammen BR017, BR046 en BR126 bevatten enkel het toxine B gen; het toxine A gen bevat een deletie en wordt daarom niet vertaald tot een functioneel eiwit. Vier *C. difficile* stammen (BR027, BR075, CD1067 en CD1165) ontbreken het toxine B gen.

De mogelijkheid om PCR te gebruiken als snelle diagnostische tool voor identificatie van toxinegenen bevattende *C. difficile* stammen met in fecesstalen werd reeds aangetoond (Lemee et al., 2004; Pituch et al., 2005). Een opmerking daaromtrent is dat de aanwezigheid van de toxinegenen niet altijd betekent dat de toxines ook effectief worden geproduceerd en de desbetreffende *C. difficile* stam al dan niet virulent is.

4.5.3 Aanwezigheid van binaire toxinegenen

Niet alle *C. difficile* stammen bevat de binaire toxinegenen. De *C. difficile* stammen die de binair toxinegenen bevatten zijn BR023, BR027, BR046, BR075, BR078, BR126, BR131, CD1067 en CD1165.

4.6 Conclusie

In dit project werd gezocht naar een betere oplossing voor *Clostridium difficile* infecties dan de huidige antibioticabehandeling met metronidazol en vancomycine. Hiervoor werden twee onbekende antimicrobiële componenten onderzocht.

De eerste component, afkomstig van een *B. amyloliquefaciens* stam, is waarschijnlijk een nog ongedefinieerd lipopeptide. In een lage dosis is de component niet cytotoxisch en heeft het een beperkte antibacteriële activiteit tegen andere bacteriën dan *C. difficile*.

De tweede component, afkomstig van de *C. perfringens* stam 38, heeft verdere karakterisatie, opzuivering en identificatie nodig.

Beide componenten hebben potentieel om als succesvolle behandeling gebruikt te worden voor *C. difficile* infecties in de toekomst. Deze componenten kunnen aan de patiënten gegeven worden in opgezuiverde vorm of als probiotische stam. Het gebruik van beide moet strenge selectieproeven doorstaan van het Federaal Agentschap voor Geneesmiddelen en Gezondheidsproducten (FAGG) alvorens het als medicijn op de markt geraakt.

5. MATERIAAL EN METHODEN

5.1 KARAKTERISATIE AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

5.1.1 MAXIMALE PRODUCTIE AMC

Om een verband te leggen tussen de groei van BA en de productie van de antibacteriële component, werd er een groeicurve opgesteld. Drie onafhankelijke BA culturen werden 2000 maal verdund in 200 ml TSB in duplicaat en schuddend geïncubeerd bij 30°C (Add. 7.1). Er werd elke 2 u een staal van 3 ml genomen, waarvan de OD gemeten werd bij 600 nm en het supernatans verzameld werd na centrifugatie (10 min, 14.000 RPM, 4°C). Met het BA SN werd de antibacteriële activiteit tegen CDVPI bepaald d.m.v. een agar well diffusie test (Add. 7.2). Elke 4 u werd tevens een staal genomen waarmee de *colony forming units* (CFU) werden berekend a.d.h.v. een titratietest (Add. 7.2).

5.1.2 INVLOED VAN PH

Om het effect van pH op de antibacteriële activiteit van de AMC te bestuderen, werd een BA cultuur overnacht opgegroeid in 300 ml TSB bij 30°C (Add. 7.1). Het supernatans werd verzameld na centrifugatie (15 min, 4750 RPM, 4°C) en gefilterd. Het supernatans werd verdeeld per 10 ml. De pH-waarden van 2 t.e.m. 12 werden getest door toevoeging van 6 M HCl of 1 M NaOH. De stalen werden gedurende 1 u geïncubeerd bij 4°C. Daarna werden de stalen gecentrifugeerd (15 min, 4750 RPM, 4°C) en de pH van het supernatans terug aangepast tot pH 7. De pellets werden opgelost in 10 ml *Hank's Balanced Salt Solution* ($HBSS^-$). De stalen werden bij 4°C bewaard en getest m.b.v. een agar well diffusietest tegen CDVPI (Add. 7.2). Dit experiment werd 7 maal onafhankelijk uitgevoerd.

5.1.3 INVLOED VAN TEMPERATUUR

Om de hittestabiele eigenschappen van de AMC van *B. amyloliquefaciens* te onderzoeken, werd een hittestabiliteitstest uitgevoerd. Een BA cultuur werd overnacht opgegroeid in 300 ml TSB bij 30°C en na centrifugeren (15 min, 4750 RPM, 4°C) werd het supernatans verzameld (Add. 7.1). Vijfhonderd µl BA SN werd gedurende 10 min bij een bepaalde temperatuur geïncubeerd. De temperaturen liepen op van 40°C tot 120°C, met een verschil van telkens 10°C. Nadien werden de stalen bewaard bij 4°C en de antibacteriële activiteit getest tegen CDVPI m.b.v. een agar well diffusietest (Add. 7.2). Dit experiment werd 3 maal onafhankelijk uitgevoerd.

5.1.4 INVLOED VAN PROTEASEN

Een BA cultuur werd overnacht opgegroeid in 300 ml TSB bij 30°C en na centrifugeren (15 min, 4750 RPM, 4°C) werd het gefilterd supernatans verzameld (Add. 7.1). Verschillende proteasen werden toegevoegd aan BA SN om te zien of de AMC wordt afgebroken en zo zijn antibacteriële activiteit verliest. De geteste proteasen zijn telkens 1 mg/ml pepsine, proteinase P, proteinase K, trypsine, chymotrypsine en pronase. Als negatieve controle werd

$HBSS^-$ toegevoegd. De stalen werden verzamend na 1 uur en na 24 u incubatie bij 37°C en bewaard bij 4°C. De antibacteriële activiteit van de stalen werd gemeten m.b.v. een agar well diffusietest tegen CDVPI (Add. 7.2). Dit experiment werd 3 maal onafhankelijk uitgevoerd. Er werd eenmaal een positieve controle uitgevoerd om de proteaseactiviteit te valideren. Hiervoor werd 1mg/ml albumine in aanwezigheid van $HBSS^-$, 1 mg/ml pepsine, 1 mg/ml proteinase 1 mg/ml P, proteinase K, 1 mg/ml trypsine, 1 mg/ml chymotrypsine en 1 mg/ml pronase geïncubeerd voor 1 u en 24 u bij 37°C. De proteolytische afbraak van albumine werd gecontroleerd met SDS-PAGE en gevisualiseerd m.b.v. Coomassie Brilliant Blue (Add. 7.2).

5.1.5 Effect van BA SN op darmcellen *in vitro*

Om de cytotoxische activiteit van BA SN op Caco-2 cellen te testen werd een NRU assay uitgevoerd. Caco-2 cellen, afgeleid van humaan coloncarcinoom (ATCC HTB-37), werden opgegroeid in Caco-2 medium (10% foetaal kalfsserum (FBS), 1% niet-essentiële aminozuren (NEMA), 1% penicilline/streptomycine, 1% kanamycine, 2 mM L-glutamine en 0,1% fungizone in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)) en geïncubeerd bij 37°C in een atmosfeer met 5% CO2 en 95% relatieve vochtigheid. De cellen werden gegroeid tot confluentie werd bereikt, verzameld door incubatie met 0.26% trypsine en 1 mM ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) in $HBSS^+$ bij 37°C gedurende 10 min en geteld in een Bürker telkamer. De leefbaarheid van de cellen werd nagegaan met een 3/2 verdunning in 5% w/v tryptaan blauw. Er werden telkens 5.10^5 Caco-2 cellen per well gezaaid in een 96 wellplaat. De wellplaat werd vooraf overnacht gecoat met 5 µg/ml collageen (Collagen I Rat Tail, GIBCO). In de buitenste wells werden geen cellen gezaaid.

Na 24 u incubatie werd het medium verwijderd. De testcomponenten waren opgeconcentreerd BA SN (BA ZP) in drievoud en BA SN in tweevoud. Tevens werd een positieve controle met 10 mg/ml sodium dodecyl sulfaat (SDS) getest. Van elke testcomponent werd een tienvoudige verdunningsreeks gemaakt en 100 µl toegevoegd (Figuur 7.6). Daarnaast werden ook 6 wells met een 100 µl antibioticavrij Caco-2 medium en 6 wells met 100 µl TSB medium gevuld (Figuur 7.6).

Na 3 u incubatie werd de 96 wellplaat gewassen met 300 µl voorverwarmd $HBSS^+$ en 150 µl neutraal rood (NR) medium (1,25% v/v NR stock oplossing in voorverwarmd Caco-2 medium; Sigma–Aldrich) toegevoegd. Na nogmaals 3 u incubatie werd gewassen met 250 µl voorverwarmd $HBSS^+$ en werd 100 µl NR desorptie medium (1% glaciale azijnzuur, 50% ethanol en 49% gedestilleerd water (AD)) toegevoegd. De 96 wellplaat werd afgeschermd van het licht en gedurende 20 min geschud tot een homogene suspensie werd bekomen. De absorptie werd gemeten bij 550 nm m.b.v. een microplaat ELISA lezer. Dit experiment werd in drievoud uitgevoerd.

5.2 Opzuivering AMC van *B. amyloliquefaciens*

5.2.1 Zuurprecipitatie BA SN

Een BA cultuur werd overnacht opgegroeid in 800 ml MOLP bij 30°C en na centrifugeren (15 min, 4750 RPM, 4°C) werd het supernatans verzameld en gefilterd (Add. 7.1). De pH van het supernatans werd aangepast naar pH 2 m.b.v. 6 M HCl en overnacht geïncubeerd bij 4°C. Het gevormde precipitaat werd verzameld door centrifugatie gedurende 1 u bij 4750 RPM en 4°C, geresuspendeerd in $HBSS^-$ en de pH werd geneutraliseerd met 1 M NaOH.

5.2.2 *SOLID PHASE EXTRACTION* CHROMATOGRAFIE

Met het opgeconcentreerde BA SN werd SPE chromatografie uitgevoerd. De kolom werd eerst gewassen met gefilterd AD. Vervolgens werd het staal op de kolom gebracht en de doorloop opgevangen. De kolom werd tweemaal gewassen met 20 ml gefilterd AD (per 20 ml; was 1 en was 2) en tweemaal met 20 ml 50% methanoloplossing (per 10 ml; was 3, was 4, was 5 en was 6). Er werd geëlueerd met tweemaal met 20 ml 100% methanoloplossing (per 10 ml; staal 0, 1, 2, 3). Alle stalen werden getest op activiteit tegen CDVPI m.b.v. een agar well diffusietest (Add. 7.2). Driemaal 2 ml van het actiefste staal werd opgestuurd naar L-ProBE (Faculteit Wetenschappen, Ugent) ter verdere opzuivering m.b.v. HPLC.

5.2.3 *HIGH PRESSURE LIQUID* CHROMATOGRAFIE

De opgestuurde stalen, driemaal 2 ml van het actiefste staal, werd in L-ProBE (Faculteit Wetenschappen, Ugent) gedroogd m.b.v. een speedvac, opnieuw opgelost in 100 µl AD en op een C18 HPLC kolom geladen. Hierbij werden er twee buffers gebruikt, buffer A: 0,1% trifluorazijnzuur (TFA) in AD en buffer B: 0,1% TFA in acetonitril (ACN); waarbij de verhouding van buffer B gradueel steeg. In de eerste 60 min steeg buffer B van 30%-70%; in de volgende 5 min steeg buffer B van 70%-100%; dan werd de buffer B bij 100% gehouden voor 5 min; als laatste werd de buffer B terug verlaagd tot 30% in 10 min. Elke minuut werd een fractie opgevangen.

Na scheiding op de HPLC kolom werden de bekomen fracties getest op activiteit tegen CDVPI m.b.v. een agar well diffusietest (Add. 7.2). De actiefste fractie hiervan werd opgestuurd naar de Vakgroep Veterinaire Volksgezondheid en Voedselveiligheid (Faculteit Diergeneeskunde, UGent).

5.2.4 HPLC-ESI MASSASPECTROMETRIE

Er werden drie soorten stalen geanalyseerd m.b.v. ESI massaspectrometrie. Allereerst werd 50 ng/µl commercieel beschikbaar surfactine (Sigma-Aldrich), opgelost in methanol, rechtstreeks op een *linear ion trap quadrupole-Orbitrap*-ESI massaspectrometer (LTQ-ESI MS) geladen om na te gaan of lipopeptiden met deze methode gedetecteerd kunnen worden. Vervolgens werd het actief staal, bekomen na SPE chromatografie, op de kolom geladen om na te gaan welke lipopeptiden er in het staal aanwezig zijn. Als laatste werd het opgezuiverd actief staal, bekomen na HPLC scheiding, geanalyseerd. Scheiding van de stalen gebeurde op een C18 HPLC kolom met twee buffers, buffer A: 0,1% mierenzuur in AD en buffer B: 0,1 mierenzuur in ACN; waarbij de verhouding van de buffers veranderen. Er werd gestart met 10% buffer B, na 25 min werd buffer B verhoogd tot 100%, na 30,10 min werd buffer B terug verlaagd tot 10%, na 40 werd buffer B bij 0% gehouden.

5.3 SELECTIVITEIT AMC VAN *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

BA werd overnacht opgegroeid in 250 ml MOLP medium bij 30°C en na centrifugeren (15 min, 4750 RPM, 4°C) werd het gefilterd supernatans verzameld (Add. 7.1). Een gedeelte van het SN werd bewaard bij 4°C en het andere deel werd vijftig maal opgeconcentreerd door zuurprecipitatie zoals reeds hoger beschreven.

Een selectie aerobe en anaerobe isolaten (Tabel 3.1) werd overnacht opgegroeid in BHI of MRS broth. Elke isolaat werd honderd maal verdund in $HBSS^-$ en uitgeplaat op BHI of MRSA agar. In de agarplaat werden wells gemaakt m.b.v. steriele filtertips. De wells werden gevuld met 40 µl BA SN of 40 µl BA ZP en de platen werden overnacht geïncubeerd bij 37°C. De platen met *Yersinia* isolaten werden geïncubeerd bij 30°C. Dit experiment werd in drievoud uitgevoerd.

5.4 ANTIBACTERIËLE ACTIVITEIT VAN *C. PERFRINGENS*

5.4.1 OPTIMALISATIE

MEDIA

Elk gebruikt media (BHI gesupplementeerd met 6 g/l fructose, CDB met 40 g/l proteose pepton (CDB1), CDB met 30 g/l proteose pepton (CDB2), CDB met 20 g/l proteose pepton (CDB3), CDB met 10 g/l proteose pepton (CDB4) en CDB met 5 g/l proteose pepton (CDB5)) werd vooraf overnacht geïncubeerd bij 37°C in de anaerobe kast (Add. 7.1). Een CP38 overnachtcultuur werd 100 maal verdund in de verschillende media. De groei van de bacterie werd nagegaan door een tienvoudige verdunningsreeks uit te platen op RCA platen (Add. 7.1, Add. 7.2). Na zeven uur incubatie werden de culturen gecentrifugeerd (15 min, 4750 RPM, 4°C) en het supernatans verzameld. Het gefilterd supernatans werd op een vivaspinfilter gebracht en 20 maal opgeconcentreerd door centrifugatie (6 u, 4750 RPM, 4°C). Een tweevoudige verdunningsreeks van het CP SN werd vervolgens getest m.b.v. een agar well diffusietest tegen CDVPI (Add. 7.2).

VIVASPIN VS. AMMONIUMSULFAATPRECIPITATIE

CP SN van een CP38 cultuur, opgegroeid in CDB2 medium werd verzameld zoals hoger beschreven. Twintig ml CP SN werd op een vivaspinfilter gebracht en 10 maal opgeconcentreerd (4 u, 4750 RPM, 4°C). Aan veertig ml CP SN werd 22,68 gram ammoniumsulfaat toegevoegd zodat een saturatiegraad van 80% ammoniumsulfaat werd bekomen. Het ammoniumsulfaat werd erg traag toegevoegd zodat er geen lokale concentratieverschillen zijn. De oplossing werd gedurende 1 u geïncubeerd bij 4°C. Het precipitaat werd na centrifugeren (10 min, 4750 RPM, 4°C) opnieuw opgelost in 800 µl $HBSS^-$ zodat een opconcentratie van 50 maal bekomen werd. Beide stalen werden getest m.b.v. een agar well diffusietest tegen CDVPI (Add. 7.2).

5.4.2 OPZUIVERING AMC VAN CP SN

CP SN van een CP38 cultuur werd verzameld zoals hoger beschreven, 40 maal opgeconcentreerd m.b.v. een vivaspinfilter en getest op antibacteriële activiteit tegen CDVPI m.b.v. een agar well diffusietest (Add. 7.2). Nadien werd het CP SN gescheiden m.b.v. IEC.

Bij anion-uitwisselingschromatografie werd een econo-kolom (Biorad) gevuld met een Q-sepharosematrix (Fast Flow; GE Healthcare Life Sciences) met een volume van 1 ml. Na de kolom eenmaal te wassen met AD, werd de kolom gewassen met de startbuffer (10 mM 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) buffer pH 8,5). Opgeconcentreerd SN werd 1:1 verdund in 20 mM Tris-buffer pH 8,5 en op de kolom gepipetteerd. De doorloop werd opgevangen. Na tweemaal te wassen met 3 ml 10 mM Tris-buffer pH 8,5 (was 1 en was 2),

werd driemaal geëlueerd met 1 ml 1M NaCl in 10 mM Tris-buffer pH 8,5 (staal 0, staal 1 en staal 2).

De fracties van de anion-uitwisselingschromatografie werden getest op antibacteriële activiteit tegen CDVPI m.b.v. een agar well diffusietest (Add. 7.2). Vervolgens werd de doorloop van de anion-uitwisselingschromatografie onderworpen aan kation-uitwisselingschromatografie.

Bij kation-uitwisselingschromatografie werd een econo-kolom (Biorad) gevuld met een SP-sepharosematrix (Fast Flow; GE Healthcare Life Sciences) met een volume van 1 ml. Na de kolom eenmaal te wassen met AD, werd de kolom gewassen met de startbuffer (10 mM Tris-buffer pH 8,5) en de doorloop van de anion-uitwisselingschromatografie op de kolom gepipetteerd. De doorloop werd opgevangen. Na tweemaal te wassen met 3 ml 10 mM Tris-buffer pH 8,5 (was 1 en was 2), werd geëlueerd met 3 ml 1M NaCl in 10 mM Tris-buffer pH 8,5 (staal 0, staal 1 en staal 2).

De fracties van de kation-uitwisselingschromatografie werden eveneens getest op antibacteriële activiteit tegen CDVPI m.b.v. een agar well diffusietest (Add. 7.2).

5.5 BEPALING VAN TOXINEGENEN VAN *C. DIFFICILE* STAMMEN

De aanwezigheid van toxinegenen werd nagegaan voor een collectie van 26 *C. difficile* stammen m.b.v. twee multiplex PCR's. De CD collectie is afkomstig van het referentielaboratorium *Université catholique de Louvain* (UCL). Een eerste PCR werd uitgevoerd om de aanwezigheid van toxine A en toxine B genen te bepalen. Een tweede PCR werd uitgevoerd om de aanwezigheid van de binaire toxinegenen te bepalen.

De *C. difficile* stammen werden geënt op CDA agar gesupplementeerd met 7% paardenbloed en gedurende twee dagen anaaeroob geïncubeerd bij 37° (Add. 7.1). DNA werd geëxtraheerd door bacteriële kolonies te suspenderen in 20 µl lysebuffer (2,5 ml 10% SDS + 5,0 ml 1M NaOH + 92,5 ml AD) en 5 min op te koken bij 95°C. Hierna werd er 180 µl AD toegevoegd en het supernatans werd na centrifugatie (5 min, 13.000 RPM, 4°C) bewaard bij -20°C. In de eerste PCR werd de aanwezigheid van de toxinegenen *tcdA* en/of *tcdB* en het huishoudgen *tpi* gecontroleerd m.b.v. de Mastercycler nexus X1 (Eppendorf AG). In de tweede PCR werd gekeken naar de aanwezigheid van de binaire toxinegenen *cdtA* en *cdtB* m.b.v. de PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research).

5.5.1 OPTIMALISATIE VAN PCR

Bij de multiplex PCR om de aanwezigheid van toxine A en B genen te bestuderen werden de volgende parameters eerst geoptimaliseerd: de primerconcentratie, het gebruik van glycerol en de DNA concentratie. De primers zijn beschreven in Tabel 5.1 en volgende vier verschillende primerconcentraties werden getest:

- set 1: 0,5 µM tcdA F en tcdA R, 0,5 µM tcdB F en tcdB R, 0,25 µM tpi F en tpi R;
- set 2: 0,25 µM tcdA F en tcdA R, 0,25 µM tcdB F en tcdB R, 0,15 µM tpi F en tpi R;
- set 3: 0,15 µM tcdA F en tcdA R, 0,15 µM tcdB F en tcdB R, 0,06 µM tpi F en tpi R;
- set 4: 0,06 µM tcdA F en tcdA R, 0,06 µM tcdB F en tcdB R, 0,03 µM tpi F en tpi R.

Er werden telkens vijf DNA stalen geanalyseerd per primerconcentratie met 1,5 µl 10x of 100x verdund DNA, 12,5 µl 1× Biomix (Bioline) en aangelengd met 50% glycerol of RNAse vrij water tot een volume van 25 µl.

Bij de multiplex PCR om de aanwezigheid van de binaire toxinegenen te bestuderen werd de hoeveelheid toegevoegd DNA per reactie bestudeerd. In een totaal volume van 15 µl werd 1,5 µl onverdund DNA vergeleken met 3 µl onverdund DNA in aanwezigheid van 7,5 µl 1× Biomix (Bioline); 0,15 µM cdtA F, cdt B, cdtA R en cdtB R (Tabel 5.1).

Table 5.1 *Clostridium difficile* primers. Sequentie van de gebruikte primers voor toxine typering van de *C. difficile* collectie. "Target", gen waarin de voorwaartse en achterwaartse primers gaan interageren; "Primer", naam van de primers (Integrated DNA Technologies); "Sequentie", DNA sequentie van primers in de 5' – 3' richting (Houser et al., 2010; Lemee et al., 2004).

Target	Primer	Sequentie
tpi	tpi F	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA
	tpi R	CATAATATTGGGTCTATTCCTAC
tcdA	tcdA F	TTCAAGCAGAAATAGAGCACTC
	tcdA R	TATCAGCCCATTGTTTTATGTATTC
tcdB	tcdB F	GGTATTACCTAATGCTCCAAATAG
	tcdB R	TTTGTGCCATCATTTTCTAAGC
cdtA	cdtA F	GGGTAAAGCAAATTATAATGATTGG
	cdtA R	CTATATACAGTTAAATTAGTTGGAATAGC
cdtB	cdtB F	TGGTGTGTCTGTTAATGTAGG
	cdtB R	CTTTGTTTATACTTAATCCAGTATTCC

5.5.2 Aanwezigheid van toxine A en toxine B genen

De tpi primers amplificeren selectief een 230-bp lang intern fragment van het triose fosfaat isomerase gen in *C. difficile*. De tcdB primers amplificeren een geconserveerde 5' regio van het toxine B gen van 160-bp lang. De unieke tcdA primers flankeren een fragment dat overeen komt met het derde en tevens kleinste deletiefragment in de 3' regio van het toxine A gen bij A^-B^+ stammen. Bij A^+B^+ stammen wordt een 369-bp lang fragment gegenereerd, bij A^-B^+ stammen een 110-bp lang fragment (Figuur 7.7).

De reacties werden uitgevoerd met 1,5 µl 10x verdund DNA; 12,5 µl 1× Biomix (Bioline); 0,15 µM tcdA forward en reverse primers; 0,25 µM tcdB forward en reverse primers; en 0,25 µM tpi forward en reverse primers (Tabel 5.1). PCR stalen werden aangelengd tot 25 µl met RNAse vrij water. Het PCR programma startte met een denaturatie bij 95°C gedurende 30 sec, primer annealing met een temperatuurgradiënt van 65°C naar 55°C gedurende de eerste 11 cycli en bij 55°C voor de resterende cycli; en amplificatie bij 72°C gedurende 30 sec. Na afloop werden de PCR stalen bewaard bij 4°C. PCR producten werden gescheiden (95 min bij 170 V) m.b.v. elektroforese van een 2% agarose gel en gevisualiseerd met ultravioletlicht. Dit experiment werd vier maal herhaald.

5.5.3 Aanwezigheid van binaire toxinegenen

De reacties werden uitgevoerd in een totaal volume van 15 µl met 3 µl DNA; 7,5 µl 1× Biomix (Bioline); 0,15 µM cdtA en cdtB R forward en reverse primers (Tabel 5.1). De volgende

condities werden gehanteerd in het PCR programma; denaturatie bij 95°C gedurende 10 min gevolgd door 35 cycli bestaande uit denaturatie bij 95°C gedurende 1 min, primer annealing bij 54°C gedurende 1 min en amplificatie bij 72°C gedurende 1 min. Na afloop werden PCR stalen bewaard bij 4°C. PCR producten werden gescheiden (75 min bij 170 V) m.b.v. elektroforese van een 1,5% agarose gel en gevisualiseerd met ultravioletlicht. Dit experiment werd vier maal herhaald.

6. REFERENTIES

Åkerlund, T., Persson, I., Unemo, M., Norén, T., Svenungsson, B., Wullt, M., and Burman, L.G. (2008). Increased Sporulation Rate of Epidemic Clostridium difficile Type 027/NAP1. J. Clin. Microbiol. *46*, 1530–1533.

Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., and Thonart, P. (2001). Influence of culture conditions on lipopeptide production by Bacillus subtilis. Appl. Biochem. Biotechnol. *91-93*, 551–561.

Alfa, M.J., Kabani, A., Lyerly, D., Moncrief, S., Neville, L.M., Al-Barrak, A., Harding, G.K., Dyck, B., Olekson, K., and Embil, J.M. (2000). Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile responsible for a nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea. J. Clin. Microbiol. *38*, 2706–2714.

Alouf, E.J., and Popoff, M.R. (2006). The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Third Edition).

Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., and Jofré, E. (2012). The plant-associated Bacillus amyloliquefaciens strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. J. Appl. Microbiol. *112*, 159–174.

Amimoto, K., Noro, T., Oishi, E., and Shimizu, M. (2007). A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of Clostridium perfringens type C. Microbiology *153*, 1198–1206.

Appel, W. (1986). Chymotrypsin: molecular and catalytic properties. Clin. Biochem. *19*, 317–322.

Arakawa, R., Shimomae, Y., Morikawa, H., Ohara, K., and Okuno, S. (2004). Mass spectrometric analysis of low molecular mass polyesters by laser desorption/ionization on porous silicon. J. Mass Spectrom. *39*, 961–965.

Ausiello, C.M., Cerquetti, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Nasso, M., Frezza, S., and Mastrantonio, P. (2006). Surface layer proteins from Clostridium difficile induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. Microbes Infect. Inst. Pasteur *8*, 2640–2646.

Baban, S.T., Kuehne, S.A., Barketi-Klai, A., Cartman, S.T., Kelly, M.L., Hardie, K.R., Kansau, I., Collignon, A., and Minton, N.P. (2013). The Role of Flagella in Clostridium difficile Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. PLoS ONE *8*, e73026.

Barbut, F., and Petit, J.C. (2001). Epidemiology of Clostridium difficile-associated infections. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *7*, 405–410.

Barbut, F., Decré, D., Lalande, V., Burghoffer, B., Noussair, L., Gigandon, A., Espinasse, F., Raskine, L., Robert, J., Mangeol, A., et al. (2005). Clinical features of Clostridium difficile-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. J. Med. Microbiol. *54*, 181–185.

Barker, R.H., Jr, Dagher, R., Davidson, D.M., and Marquis, J.K. (2006). Review article: tolevamer, a novel toxin-binding polymer: overview of preclinical pharmacology and physicochemical properties. Aliment. Pharmacol. Ther. *24*, 1525–1534.

Bartlett, J.G., Chang, T.W., Moon, N., and Onderdonk, A.B. (1978). Antibiotic-induced lethal enterocolitis in hamsters: studies with eleven agents and evidence to support the pathogenic role of toxin-producing Clostridia. Am. J. Vet. Res. *39*, 1525–1530.

Bartlett, J.G. (1994). Clostridium difficile: History of Its Role as an Enteric Pathogen and the Current State of Knowledge About the Organism. Clin. Infect. Dis. *18*, S265–S272.

Bartlett, J.G., and Gerding, D.N. (2008). Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. Clin. Infect. Dis. *46*, S12–S18.

Beaugerie, L., Flahault, A., Barbut, F., Atlan, P., Lalande, V., Cousin, P., Cadilhac, M., Petit, J.-C., and Study Group (2003). Antibiotic-associated

diarrhoea and Clostridium difficile in the community. Aliment. Pharmacol. Ther. *17*, 905–912.

Beveridge, T.J., Pouwels, P.H., Sára, M., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Kari, K., Kerosuo, E., Haapasalo, M., Egelseer, E.M., Schocher, I., et al. (1997). Functions of S-layers. FEMS Microbiol. Rev. *20*, 99–149.

Bolton, R.P., Tait, S.K., Dear, P.R., and Losowsky, M.S. (1984). Asymptomatic neonatal colonisation by Clostridium difficile. Arch. Dis. Child. *59*, 466–472.

Bomers, M.K., van Agtmael, M.A., Luik, H., van Veen, M.C., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., and Smulders, Y.M. (2012). Using a dog's superior olfactory sensitivity to identify Clostridium difficile in stools and patients: proof of principle study. BMJ *345*, e7396–e7396.

Borriello, S. p., Davies, H.A., and Barclay, F.E. (1988). Detection of fimbriae amongst strains of Clostridium difficile. FEMS Microbiol. Lett. *49*, 65–67.

Borriello, S.P., Davies, H.A., Kamiya, S., Reed, P.J., and Seddon, S. (1990). Virulence Factors of Clostridium difficile. Clin. Infect. Dis. *12*, S185–S191.

Borriello, S.P. (1998). Pathogenesis of Clostridium difficile infection. J. Antimicrob. Chemother. *41*, 13–19.

Brazier, J.S. (1998). The diagnosis of Clostridium difficile-associated disease. J. Antimicrob. Chemother. *41*, 29–40.

Brazier, J.S., Fitzgerald, T.C., Hosein, I., Cefai, C., Looker, N., Walker, M., Bushell, A.C., and Rooney, P. (1999). Screening for carriage and nosocomial acquisition of Clostridium difficile by culture: a study of 284 admissions of elderly patients to six general hospitals in Wales. J. Hosp. Infect. *43*, 317–319.

Brazier, J.S. (2008). Clostridium difficile: from obscurity to superbug. Br. J. Biomed. Sci. *65*, 39–44.

Brito, G.A.C., Fujji, J., Carneiro-Filho, B.A., Lima, A.A.M., Obrig, T., and Guerrant, R.L. (2002). Mechanism of Clostridium difficile Toxin A–Induced Apoptosis in T84 Cells. J. Infect. Dis. *186*, 1438–1447.

Brouwer, M.S.M., Warburton, P.J., Roberts, A.P., Mullany, P., and Allan, E. (2011). Genetic Organisation, Mobility and Predicted Functions of Genes on Integrated, Mobile Genetic Elements in Sequenced Strains of Clostridium difficile. PLoS ONE *6*.

Brouwer, M.S.M., Roberts, A.P., Mullany, P., and Allan, E. (2012). In silico analysis of sequenced strains of Clostridium difficile reveals a related set of conjugative transposons carrying a variety of accessory genes. Mob. Genet. Elem. *2*, 8–12.

Burdette, S.D., and Bernstein, J.M. (2007). Does the Nose Know? The Odiferous Diagnosis of Clostridium difficile-Associated Diarrhea. Clin. Infect. Dis. *44*, 1142–1142.

Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., Morris, H., Dell, A., Dougan, G., and Fairweather, N. (2001). Molecular characterization of the surface layer proteins from Clostridium difficile. Mol. Microbiol. *40*, 1187–1199.

Calabi, E., and Fairweather, N. (2002a). Patterns of sequence conservation in the S-Layer proteins and related sequences in Clostridium difficile. J. Bacteriol. *184*, 3886–3897.

Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A.D., and Fairweather, N.F. (2002b). Binding of Clostridium difficile Surface Layer Proteins to Gastrointestinal Tissues. Infect. Immun. *70*, 5770–5778.

Caldeira, A.T., Santos Arteiro, J.M., Coelho, A.V., and Roseiro, J.C. (2011). Combined use of LC–ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by Bacillus amyloliquefaciens CCMI 1051. Process Biochem. *46*, 1738–1746.

Calfee, D. (2008). Clostridium difficile: a reemerging pathogen. Geriatrics *63*, 10–21.

Carter, G.P., Lyras, D., Allen, D.L., Mackin, K.E., Howarth, P.M., O'Connor, J.R., and Rood, J.I. (2007). Binary Toxin Production in Clostridium difficile Is Regulated by CdtR, a LytTR Family Response Regulator. J. Bacteriol. *189*, 7290–7301.

Carvalho, A.L.U. de, Oliveira, F.H.P.C. de, Mariano, R. de L.R., Gouveia, E.R., and Souto-Maior, A.M. (2010). Growth, sporulation and production of bioactive compounds by Bacillus subtilis R14. Braz. Arch. Biol. Technol. *53*, 643–652.

Castagliuolo, I., LaMont, J.T., Qiu, B., Nikulasson, S.T., and Pothoulakis, C. (1996). A receptor decoy inhibits the enterotoxic effects of Clostridium difficile toxin A in rat ileum. Gastroenterology *111*, 433–438.

CDC, 2014. Clostridium difficile Infection (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP)). http://www.cdc.gov/HAI/organisms/cdiff/Cdiff_infect.html

Cheng, S., Chen, Y., Monforte, J.A., Higuchi, R., and Van Houten, B. (1995). Template integrity is essential for PCR amplification of 20- to 30-kb sequences from genomic DNA. PCR Methods Appl. *4*, 294–298.

Citron, D.M., Tyrrell, K.L., Merriam, C.V., and Goldstein, E.J.C. (2012). In Vitro Activities of CB-183,315, Vancomycin, and Metronidazole against 556 Strains of Clostridium difficile, 445 Other Intestinal Anaerobes, and 56 Enterobacteriaceae Species. Antimicrob. Agents Chemother. *56*, 1613–1615.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. *71*, 1–20.

Cloud, J., and Kelly, C.P. (2007). Update on Clostridium difficile associated disease. Curr. Opin. Gastroenterol. *23*, 4–9.

Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., and Farrow, J.A. (1994). The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int. J. Syst. Bacteriol. *44*, 812–826.

Crobach, M.J.T., Dekkers, O.M., Wilcox, M.H., and Kuijper, E.J. (2009). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI). Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *15*, 1053–1066.

Cubillos, S., Norgauer, J., and Lehmann, K. (2010). Toxins-Useful Biochemical Tools for Leukocyte Research. Toxins *2*, 428–452.

Cunningham, R., Dale, B., Undy, B., and Gaunt, N. (2003). Proton pump inhibitors as a risk factor for Clostridium difficile diarrhoea. J. Hosp. Infect. *54*, 243–245.

Cunningham, R. (2006). Proton pump inhibitors and the risk of Clostridium difficile-associated disease: further evidence from the community. CMAJ Can. Med. Assoc. J. *175*, 757.

Davey, P., Brown, E., Fenelon, L., Finch, R., Gould, I., Holmes, A., Ramsay, C., Taylor, E., Wiffen, P., and Wilcox, M. (2006). Systematic review of antimicrobial drug prescribing in hospitals. Emerg. Infect. Dis. *12*, 211–216.

Davey, P., Brown, E., Charani, E., Fenelon, L., Gould, I.M., Holmes, A., Ramsay, C.R., Wiffen, P.J., and Wilcox, M. (2013). Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. Cochrane Database Syst. Rev. *4*, CD003543.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. *16*, 1058–1071.

Delmée, M., Avesani, V., Delferriere, N., and Burtonboy, G. (1990). Characterization of flagella of Clostridium difficile and their role in serogrouping reactions. J. Clin. Microbiol. *28*, 2210–2214.

Delmée, M. (2001). Laboratory diagnosis of Clostridium difficile disease. Clin. Microbiol. Infect. *7*, 411–416.

Dial, S., Delaney, J.A.C., Barkun, A.N., and Suissa, S. (2005). Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired Clostridium difficile-associated disease. JAMA J. Am. Med. Assoc. *294*, 2989–2995.

Dobson, A., Crispie, F., Rea, M.C., O'Sullivan, O., Casey, P.G., Lawlor, P.G., Cotter, P.D., Ross, P., Gardiner, G.E., and Hill, C. (2011). Fate and efficacy of lacticin 3147-producing Lactococcus lactis in the mammalian gastrointestinal tract. FEMS Microbiol. Ecol. *76*, 602–614.

Drudy, D., Calabi, E., Kyne, L., Sougioultzis, S., Kelly, E., Fairweather, N., and Kelly, C.P. (2004). Human antibody response to surface layer proteins in Clostridium difficile infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. *41*, 237–242.

Dubberke, E.R., Reske, K.A., Olsen, M.A., McDonald, L.C., and Fraser, V.J. (2008). Short- and long-term attributable costs of Clostridium difficile-associated disease in nonsurgical inpatients. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *46*, 497–504.

Dudley, M.N., McLaughlin, J.C., Carrington, G., Frick, J., Nightingale, C.H., and Quintiliani, R. (1986). Oral bacitracin vs vancomycin therapy for Clostridium difficile-induced diarrhea. A randomized double-blind trial. Arch. Intern. Med. *146*, 1101–1104.

Dupuy, B., and Sonenshein, A.L. (1998). Regulated transcription of Clostridium difficile toxin genes. Mol. Microbiol. *27*, 107–120.

Dupuy, B., Govind, R., Antunes, A., and Matamouros, S. (2008). Clostridium difficile toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. J. Med. Microbiol. *57*, 685–689.

ECDC, 2012. Clostridium difficile infection: Basic facts (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)). http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcare associated_infections/clostridium_difficile_infection/Pages/basic_facts.aspx

von Eichel-Streiber, C., Laufenberg-Feldmann, R., Sartingen, S., Schulze, J., and Sauerborn, M. (1992). Comparative sequence analysis of theClostridium difficile toxins A and B. Mol. Gen. Genet. MGG *233*, 260–268.

von Eichel-Streiber, C., Boquet, P., Sauerborn, M., and Thelestam, M. (1996). Large clostridial cytotoxins--a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. Trends Microbiol. *4*, 375–382.

Elliott, B., Chang, B.J., Golledge, C.L., and Riley, T.V. (2007). Clostridium difficile-associated diarrhoea. Intern. Med. J. *37*, 561–568.

EMA, 2011. Dificlir, fidaxomicin (European Medicines Agency (EMA), European Medicines Agency's Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/002087/WC500119708.pdf

Encyclopedie, 2014. *Clostridium difficile*. http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_difficile

Fawley, W.N., Underwood, S., Freeman, J., Baines, S.D., Saxton, K., Stephenson, K., Owens, R.C., Jr, and Wilcox, M.H. (2007). Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic Clostridium difficile strains. Infect. Control Hosp. Epidemiol. Off. J. Soc. Hosp. Epidemiol. Am. *28*, 920–925.

FDA, 2014. Dificlir fidaxomicin (Food and Drug Administration (FDA)). http://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/ucm143534.htm

Fimlaid, K.A., Bond, J.P., Schutz, K.C., Putnam, E.E., Leung, J.M., Lawley, T.D., and Shen, A. (2013). Global Analysis of the Sporulation Pathway of Clostridium difficile. PLoS Genet *9*, e1003660.

Fitzpatrick, L.R., Small, J.S., Greene, W.H., Karpa, K.D., and Keller, D. (2011). Bacillus Coagulans GBI-30 (BC30) improves indices of Clostridium difficile-Induced colitis in mice. Gut Pathog. *3*, 16.

Fitzpatrick, L.R., Small, J.S., Greene, W.H., Karpa, K.D., Farmer, S., and Keller, D. (2012). Bacillus coagulans GBI-30, 6086 limits the recurrence of Clostridium difficile-Induced colitis following vancomycin withdrawal in mice. Gut Pathog. *4*, 13.

Freeman, C.D., Klutman, N.E., and Lamp, K.C. (1997). Metronidazole. A therapeutic review and update. Drugs *54*, 679–708.

Freeman, J., Bauer, M.P., Baines, S.D., Corver, J., Fawley, W.N., Goorhuis, B., Kuijper, E.J., and Wilcox, M.H. (2010). The Changing Epidemiology of Clostridium difficile Infections. Clin. Microbiol. Rev. *23*, 529–549.

From, C., Hormazabal, V., Hardy, S.P., and Granum, P.E. (2007). Cytotoxicity in Bacillus mojavensis is abolished following loss of surfactin synthesis: implications for assessment of toxicity and food poisoning potential. Int. J. Food Microbiol. *117*, 43–49.

Galindo, C.L., Rosenzweig, J.A., Kirtley, M.L., and Chopra, A.K. (2011). Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. J. Pathog. *2011*, e182051.

Garey, K.W., Jiang, Z.-D., Bellard, A., and Dupont, H.L. (2009). Rifaximin in treatment of recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea: an uncontrolled pilot study. J. Clin. Gastroenterol. *43*, 91–93.

Gaynes, R., Rimland, D., Killum, E., Lowery, H.K., Johnson, T.M., Killgore, G., and Tenover, F.C. (2004). Outbreak of Clostridium difficile Infection in a Long-Term Care Facility: Association with Gatifloxacin Use. Clin. Infect. Dis. *38*, 640–645.

Gerding, D.N., Johnson, S., Peterson, L.R., Mulligan, M.E., and Silva, J., Jr (1995). Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. Infect. Control Hosp. Epidemiol. Off. J. Soc. Hosp. Epidemiol. Am. *16*, 459–477.

Gerding, D.N., Muto, C.A., and Owens, R.C., Jr (2008). Measures to control and prevent Clostridium difficile infection. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *46 Suppl 1*, S43–49.

Gerhard, R., Nottrott, S., Schoentaube, J., Tatge, H., Olling, A., and Just, I. (2008). Glucosylation of Rho GTPases by Clostridium difficile toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. J. Med. Microbiol. *57*, 765–770.

Geric, B., Carman, R.J., Rupnik, M., Genheimer, C.W., Sambol, S.P., Lyerly, D.M., Gerding, D.N., and Johnson, S. (2006). Binary Toxin–Producing, Large Clostridial Toxin–Negative Clostridium difficile Strains Are Enterotoxic but Do Not Cause Disease in Hamsters. J. Infect. Dis. *193*, 1143–1150.

Ghose, C. (2013). Clostridium difficile infection in the twenty-first century. Emerg. Microbes Infect. *2*, e62.

Gould, L.H., and Limbago, B. (2010). Clostridium difficile in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen? Clin. Infect. Dis. *51*, 577–582.

Gu, X.-B., Zheng, Z.-M., Yu, H.-Q., Wang, J., Liang, F.-L., and Liu, R.-L. (2005). Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by Bacillus subtilis MO-01 by a response surface method. Process Biochem. *40*, 3196–3201.

Hall I.C., and O'Toole E. (1935). Intestinal flora in new-born infants: With a description of a new pathogenic anaerobe, bacillus difficilis. Am. J. Dis. Child. *49*, 390–402.

Hamm, E.E., Voth, D.E., and Ballard, J.D. (2006). Identification of Clostridium difficile toxin B cardiotoxicity using a zebrafish embryo model of intoxication. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 14176–14181.

Hammitt, M.C., Bueschel, D.M., Keel, M.K., Glock, R.D., Cuneo, P., DeYoung, D.W., Reggiardo, C., Trinh, H.T., and Songer, J.G. (2008). A possible role for Clostridium difficile in the etiology of calf enteritis. Vet. Microbiol. *127*, 343–352.

He, X., Wang, J., Steele, J., Sun, X., Nie, W., Tzipori, S., and Feng, H. (2009). An ultrasensitive rapid immunocytotoxicity assay for detecting Clostridium difficile toxins. J. Microbiol. Methods *78*, 97–100.

Heerze, L.D., Kelm, M.A., Talbot, J.A., and Armstrong, G.D. (1994). Oligosaccharide sequences attached to an inert support (SYNSORB) as potential therapy for antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. J. Infect. Dis. *169*, 1291–1296.

Hellickson, L.A., and Owens, K.L. (2007). Cross-Contamination of Clostridium difficile Spores on Bed Linen During Laundering. Am. J. Infect. Control *35*, E32–E33.

Herpers, B.L., Vlaminckx, B., Burkhardt, O., Blom, H., Biemond-Moeniralam, H.S., Hornef, M., Welte, T., and Kuijper, E.J. (2009). Intravenous tigecycline as adjunctive or alternative therapy for severe refractory Clostridium difficile infection. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *48*, 1732–1735.

Hickson, M. (2011). Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile infection. Ther. Adv. Gastroenterol. *4*, 185–197.

Hopkins, M.J., and Macfarlane, G.T. (2002). Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with Clostridium difficile infection. J. Med. Microbiol. *51*, 448–454.

Houser, B.A., Hattel, A.L., and Jayarao, B.M. (2010). Real-time multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of Clostridium difficile toxin-encoding strains. Foodborne Pathog. Dis. *7*, 719–726.

Hsieh, F.-C., Li, M.-C., Lin, T.-C., and Kao, S.-S. (2004). Rapid detection and characterization of surfactin-producing Bacillus subtilis and closely related species based on PCR. Curr. Microbiol. *49*, 186–191.

Huang, H., Weintraub, A., Fang, H., and Nord, C.E. (2009). Antimicrobial resistance in Clostridium difficile. Int. J. Antimicrob. Agents *34*, 516–522.

Hue, N., Serani, L., and Laprévote, O. (2001). Structural investigation of cyclic peptidolipids from Bacillus subtilis by high-energy tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM *15*, 203–209.

Humphreys, H., and Smyth, E.T.M. (2006). Prevalence surveys of healthcare-associated infections: what do they tell us, if anything? Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *12*, 2–4.

Hundsberger, T., Braun, V., Weidmann, M., Leukel, P., Sauerborn, M., and von Eichel-Streiber, C. (1997). Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of Clostridium difficile. Eur. J. Biochem. FEBS *244*, 735–742.

Huovinen, P. (2001). Bacteriotherapy: the time has come. BMJ *323*, 353–354.

Indra, A., Lassnig, H., Baliko, N., Much, P., Fiedler, A., Huhulescu, S., and Allerberger, F. (2009). Clostridium difficile: a new zoonotic agent? Wien. Klin. Wochenschr. *121*, 91–95.

Issel-Tarver, L., and Rine, J. (1997). The evolution of mammalian olfactory receptor genes. Genetics *145*, 185–195.

Jackson, S., Calos, M., Myers, A., and Self, W.T. (2006). Analysis of Proline Reduction in the Nosocomial Pathogen Clostridium difficile. J. Bacteriol. *188*, 8487–8495.

Jank, T., and Aktories, K. (2008). Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Trends Microbiol. *16*, 222–229.

Jank, T., Giesemann, T., and Aktories, K. (2007). Rho-glucosylating Clostridium difficile toxins A and B: new insights into structure and function. Glycobiology *17*, 15R–22R.

Jhung, M.A., Thompson, A.D., Killgore, G.E., Zukowski, W.E., Songer, G., Warny, M., Johnson, S., Gerding, D.N., McDonald, L.C., and Limbago, B.M. (2008). Toxinotype V Clostridium difficile in Humans and Food Animals. Emerg. Infect. Dis. *14*, 1039–1045.

Johansen, A., Vasishta, S., Edison, P., and Hosein, I. (2002). Clostridium difficile associated diarrhoea: how good are nurses at identifying the disease? Age Ageing *31*, 487–488.

Johnson, S., Samore, M.H., Farrow, K.A., Killgore, G.E., Tenover, F.C., Lyras, D., Rood, J.I., DeGirolami, P., Baltch, A.L., Rafferty, M.E., et al. (1999). Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of Clostridium difficile in four hospitals. N. Engl. J. Med. *341*, 1645–1651.

Johnson, S., Schriever, C., Galang, M., Kelly, C.P., and Gerding, D.N. (2007). Interruption of recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea episodes by serial therapy with vancomycin and rifaximin. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *44*, 846–848.

Johnson, S., Schriever, C., Patel, U., Patel, T., Hecht, D.W., and Gerding, D.N. (2009). Rifaximin Redux: treatment of recurrent Clostridium difficile infections with rifaximin immediately post-vancomycin treatment. Anaerobe *15*, 290–291.

Just, I., Selzer, J., Wilm, M., Eichel-Streiber, C. von, Mann, M., and Aktories, K. (1995a). Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. Nature *375*, 500–503.

Just, I., Wilm, M., Selzer, J., Rex, G., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., and Aktories, K. (1995b). The enterotoxin from Clostridium difficile (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. J. Biol. Chem. *270*, 13932–13936.

Karjalainen, T., Waligora-Dupriet, A.-J., Cerquetti, M., Spigaglia, P., Maggioni, A., Mauri, P., and Mastrantonio, P. (2001). Molecular and Genomic Analysis of Genes Encoding Surface-Anchored Proteins from Clostridium difficile. Infect. Immun. *69*, 3442–3446.

Karre, T., Sloan, L., Patel, R., Mandrekar, J., and Rosenblatt, J. (2011). Comparison of two commercial molecular assays to a laboratory-developed molecular assay for diagnosis of Clostridium difficile infection. J. Clin. Microbiol. *49*, 725–727.

Kaslow, D.C., and Shiver, J.W. (2011). Clostridium difficile and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Emerging Concepts in Vaccine Development. Annu. Rev. Med. *62*, 201–215.

Keel, M.K., and Songer, J.G. (2006). The Comparative Pathology of Clostridium difficile-associated Disease. Vet. Pathol. *43*, 225–240.

Kelly, C.P., Pothoulakis, C., and LaMont, J.T. (1994). Clostridium difficile Colitis. N. Engl. J. Med. *330*, 257–262.

Kelly, C.P., and LaMont, J.T. (2008). Clostridium difficile--more difficult than ever. N. Engl. J. Med. *359*, 1932–1940.

Kelly, C.P. (2012). Current strategies for management of initial Clostridium difficile infection. J. Hosp. Med. Off. Publ. Soc. Hosp. Med. *7 Suppl 3*, S5–10.

Kim, K.H., Fekety, R., Batts, D.H., Brown, D., Cudmore, M., Silva, J., Jr, and Waters, D. (1981). Isolation of Clostridium difficile from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. J. Infect. Dis. *143*, 42–50.

Kim, J.M., Kim, J.S., Jun, H.C., Oh, Y.-K., Song, I.S., and Kim, C.Y. (2002). Differential expression and polarized secretion of CXC and CC chemokines by human intestinal epithelial cancer cell lines in response to Clostridium difficile toxin A. Microbiol. Immunol. *46*, 333–342.

Kufelnicka, A.M., and Kirn, T.J. (2011). Effective Utilization of Evolving Methods for the Laboratory Diagnosis of Clostridium difficile Infection. Clin. Infect. Dis. *52*, 1451–1457.

Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., and Kelly, C.P. (2000). Asymptomatic carriage of Clostridium difficile and serum levels of IgG antibody against toxin A. N. Engl. J. Med. *342*, 390–397.

Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., and Kelly, C.P. (2001). Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent Clostridium difficile diarrhoea. Lancet *357*, 189–193.

Labbe, A.-C., Poirier, L., MacCannell, D., Louie, T., Savoie, M., Beliveau, C., Laverdiere, M., and Pepin, J. (2008). Clostridium difficile Infections in a Canadian Tertiary Care Hospital before and during a Regional Epidemic Associated with the BI/NAP1/027 Strain. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 3180–3187.

De Lalla, F., Nicolin, R., Rinaldi, E., Scarpellini, P., Rigoli, R., Manfrin, V., and Tramarin, A. (1992). Prospective study of oral teicoplanin versus oral vancomycin for therapy of pseudomembranous colitis and Clostridium difficile-associated diarrhea. Antimicrob. Agents Chemother. *36*, 2192–2196.

Lanis, J.M., Barua, S., and Ballard, J.D. (2010). Variations in TcdB Activity and the Hypervirulence of Emerging Strains of Clostridium difficile. PLoS Pathog *6*, e1001061.

Lawley, T.D., Clare, S., Deakin, L.J., Goulding, D., Yen, J.L., Raisen, C., Brandt, C., Lovell, J., Cooke, F., Clark, T.G., et al. (2010). Use of Purified Clostridium difficile Spores To Facilitate Evaluation of Health Care Disinfection Regimens. Appl. Environ. Microbiol. *76*, 6895–6900.

Lawrence, S.J., Korzenik, J.R., and Mundy, L.M. (2005). Probiotics for recurrent Clostridium difficile disease. J. Med. Microbiol. *54*, 905–906.

Leja, K., Myszka, K., and Czaczyk, K. (2013). The ability of Clostridium bifermentans strains to lactic acid biosynthesis in various environmental conditions. SpringerPlus *2*.

Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M.-A., Maillard, K., Lemeland, J.-F., and Pons, J.-L. (2004). Multiplex PCR Targeting tpi (Triose Phosphate Isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) Genes for Toxigenic Culture of Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. *42*, 5710–5714.

Lessa, F.C., Gould, C.V., and McDonald, L.C. (2012). Current status of Clostridium difficile infection epidemiology. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *55 Suppl 2*, S65–70.

Levett, P.N. (1986). Clostridium difficile in habitats other than the human gastro-intestinal tract. J. Infect. *12*, 253–263.

Liacouras, C.A., and Piccoli, D.A. (1996). Whole-bowel irrigation as an adjunct to the treatment of chronic, relapsing Clostridium difficile colitis. J. Clin. Gastroenterol. *22*, 186–189.

Limaye, A.P., Turgeon, D.K., Cookson, B.T., and Fritsche, T.R. (2000). Pseudomembranous Colitis Caused by a Toxin A− B+ Strain of Clostridium difficile. J. Clin. Microbiol. *38*, 1696–1697.

Loo, V.G., Poirier, L., Miller, M.A., Oughton, M., Libman, M.D., Michaud, S., Bourgault, A.-M., Nguyen, T., Frenette, C., Kelly, M., et al. (2005). A predominantly clonal multi-institutional outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea with high morbidity and mortality. N. Engl. J. Med. *353*, 2442–2449.

Lu, Y.H., and Nègre, S. (1993). Use of glycerol for enhanced efficiency and specificity of PCR amplification. Trends Genet. TIG *9*, 297.

Lyerly, D.M., Saum, K.E., MacDonald, D.K., and Wilkins, T.D. (1985). Effects of Clostridium difficile toxins given intragastrically to animals. Infect. Immun. *47*, 349–352.

Lyerly, D.M., Krivan, H.C., and Wilkins, T.D. (1988). Clostridium difficile: its disease and toxins. Clin. Microbiol. Rev. *1*, 1–18.

Lyras, D., O'Connor, J.R., Howarth, P.M., Sambol, S.P., Carter, G.P., Phumoonna, T., Poon, R., Adams, V., Vedantam, G., Johnson, S., et al. (2009). Toxin B is essential for virulence of Clostridium difficile. Nature *458*, 1176–1179.

Madslien, E.H., Rønning, H.T., Lindbäck, T., Hassel, B., Andersson, M.A., and Granum, P.E. (2013). Lichenysin is produced by most Bacillus licheniformis strains. J. Appl. Microbiol. *115*, 1068–1080.

Mainil, J.C. Duchesnes, and P. E. Granum (2006). Clostridia in medical, veterinary and food microbiology.

Mammedov, T., Pienaar, E., Whitney, S., TerMaat, J., Carvill, G., Goliath, R., Subramanian, A., and Viljoen, H. (2008). A Fundamental Study of the PCR Amplification of GC-Rich DNA Templates. Comput. Biol. Chem. *32*, 452–457.

Mascio, C.T.M., Mortin, L.I., Howland, K.T., Van Praagh, A.D.G., Zhang, S., Arya, A., Chuong, C.L., Kang, C., Li, T., and Silverman, J.A. (2012). In vitro and in vivo characterization of CB-183,315, a novel lipopeptide antibiotic for treatment of Clostridium difficile. Antimicrob. Agents Chemother. *56*, 5023–5030.

Matamouros, S., England, P., and Dupuy, B. (2007). Clostridium difficile toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. Mol. Microbiol. *64*, 1274–1288.

MBL, 2008. Massachusetts biologic laboratories and medarex announce primary objective achieved in phase 2 trial of monoclonal antibody combination for the treatment of clostridium difficile associated diarrhea (CDAD) (Medarex; The Massachusetts Biologic Laboratories (MBL) of the University of Massachusetts Medical School (UMMS)). http://www.umassmed.edu/Content.aspx?id=62670

McDonald, L.C. (2005). Clostridium difficile: responding to a new threat from an old enemy. Infect. Control Hosp. Epidemiol. Off. J. Soc. Hosp. Epidemiol. Am. *26*, 672–675.

McDonald, L.C., Owings, M., and Jernigan, D.B. (2006). *Clostridium difficile* Infection in Patients Discharged from US Short-stay Hospitals, 1996–20031. Emerg. Infect. Dis. *12*, 409–415.

McDonald, L.C., Coignard, B., Dubberke, E., Song, X., Horan, T., Kutty, P.K., and Ad Hoc Clostridium difficile Surveillance Working Group (2007). Recommendations for surveillance of Clostridium difficile-associated disease. Infect. Control Hosp. Epidemiol. Off. J. Soc. Hosp. Epidemiol. Am. *28*, 140–145.

McFarland, L.V., Mulligan, M.E., Kwok, R.Y., and Stamm, W.E. (1989). Nosocomial acquisition of Clostridium difficile infection. N. Engl. J. Med. *320*, 204–210.

McFarland, L.V. (2000a). Normal flora: diversity and functions. Microb. Ecol. Health Dis. *12*.

McFarland, L.V., and D., P. (2000b). A review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents. Microb. Ecol. Health Dis. *12*.

McFarland, L.V. (2005). Alternative treatments for Clostridium difficile disease: what really works? J. Med. Microbiol. *54*, 101–111.

Merrigan, M., Venugopal, A., Mallozzi, M., Roxas, B., Viswanathan, V.K., Johnson, S., Gerding, D.N., and Vedantam, G. (2010). Human hypervirulent Clostridium difficile strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. J. Bacteriol. *192*, 4904–4911.

Mogg, G. a. G., George, R.H., Youngs, D., Johnson, M., Thompson, H., Burdon, D.W., and Keighley, M.R.B. (1982). Randomized controlled trial of colestipol in antibiotic-associated colitis. Br. J. Surg. *69*, 137–139.

Mole, B. (2013). FDA gets to grips with faeces. Nature *498*, 147–148.

Musher, D.M., Logan, N., Hamill, R.J., Dupont, H.L., Lentnek, A., Gupta, A., and Rossignol, J.-F. (2006). Nitazoxanide for the treatment of Clostridium difficile colitis. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *43*, 421–427.

Musher, D.M., Logan, N., Bressler, A.M., Johnson, D.P., and Rossignol, J.-F. (2009). Nitazoxanide versus vancomycin in Clostridium difficile infection:

a randomized, double-blind study. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *48*, e41–46.

Muto, C.A., Pokrywka, M., Shutt, K., Mendelsohn, A.B., Nouri, K., Posey, K., Roberts, T., Croyle, K., Krystofiak, S., Patel-Brown, S., et al. (2005). A large outbreak of Clostridium difficile-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infect. Control Hosp. Epidemiol. Off. J. Soc. Hosp. Epidemiol. Am. *26*, 273–280.

Muto, C.A., Blank, M.K., Marsh, J.W., Vergis, E.N., O'Leary, M.M., Shutt, K.A., Pasculle, A.W., Pokrywka, M., Garcia, J.G., Posey, K., et al. (2007). Control of an outbreak of infection with the hypervirulent Clostridium difficile BI strain in a university hospital using a comprehensive "bundle" approach. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *45*, 1266–1273.

Navaneethan, U., Mukewar, S., GK Venkatesh, P., Lopez, R., and Shen, B. (2012). Clostridium difficile infection is associated with worse long term outcome in patients with ulcerative colitis. J. Crohns Colitis *6*, 330–336.

Nerandzic, M.M., and Donskey, C.J. (2010). Triggering Germination Represents a Novel Strategy to Enhance Killing of Clostridium difficile Spores. PLoS ONE *5*, e12285.

Ng, E.K., Panesar, N., Longo, W.E., Shapiro, M.J., Kaminski, D.L., Tolman, K.C., and Mazuski, J.E. (2003). Human intestinal epithelial and smooth muscle cells are potent producers of IL-6. Mediators Inflamm. *12*, 3–8.

Van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Visser, C.E., Kuijper, E.J., Bartelsman, J.F.W.M., Tijssen, J.G.P., et al. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile. N. Engl. J. Med. *368*, 407–415.

O'Brien, J.B., McCabe, M.S., Athié-Morales, V., McDonald, G.S.A., Ní Eidhin, D.B., and Kelleher, D.P. (2005). Passive immunisation of hamsters against Clostridium difficile infection using antibodies to surface layer proteins. FEMS Microbiol. Lett. *246*, 199–205.

O'Connor, J.R., Galang, M.A., Sambol, S.P., Hecht, D.W., Vedantam, G., Gerding, D.N., and Johnson, S. (2008). Rifampin and Rifaximin Resistance in Clinical Isolates of Clostridium difficile. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 2813–2817.

O'Horo, J., and Safdar, N. (2009). The role of immunoglobulin for the treatment of Clostridium difficile infection: a systematic review. Int. J. Infect. Dis. *13*, 663–667.

Olling, A., Seehase, S., Minton, N.P., Tatge, H., Schröter, S., Kohlscheen, S., Pich, A., Just, I., and Gerhard, R. (2012). Release of TcdA and TcdB from Clostridium difficile cdi 630 is not affected by functional inactivation of the tcdE gene. Microb. Pathog. *52*, 92–100.

Ozaki, E., Kato, H., Kita, H., Karasawa, T., Maegawa, T., Koino, Y., Matsumoto, K., Takada, T., Nomoto, K., Tanaka, R., et al. (2004). Clostridium difficile colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. J. Med. Microbiol. *53*, 167–172.

Paredes, C.J., Alsaker, K.V., and Papoutsakis, E.T. (2005). A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. Nat. Rev. Microbiol. *3*, 969–978.

Pavliakova, D., Moncrief, J.S., Lyerly, D.M., Schiffman, G., Bryla, D.A., Robbins, J.B., and Schneerson, R. (2000). Clostridium difficile recombinant toxin A repeating units as a carrier protein for conjugate vaccines: studies of pneumococcal type 14, Escherichia coli K1, and Shigella flexneri type 2a polysaccharides in mice. Infect. Immun. *68*, 2161–2166.

Péchiné, S., Janoir, C., and Collignon, A. (2005). Variability of Clostridium difficile Surface Proteins and Specific Serum Antibody Response in Patients with Clostridium difficile-Associated Disease. J. Clin. Microbiol. *43*, 5018–5025.

Péchiné, S., Janoir, C., Boureau, H., Gleizes, A., Tsapis, N., Hoys, S., Fattal, E., and Collignon, A. (2007). Diminished intestinal colonization by Clostridium difficile and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of Clostridium difficile. Vaccine *25*, 3946–3954.

Pepin, J., Valiquette, L., and Cossette, B. (2005). Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. CMAJ Can. Med. Assoc. J. *173*, 1037–1042.

Perelle, S., Gibert, M., Bourlioux, P., Corthier, G., and Popoff, M.R. (1997). Production of a complete

binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by Clostridium difficile CD196. Infect. Immun. *65*, 1402–1407.

Pillai, A., and Nelson, R.L. (1996). Probiotics for treatment of Clostridium difficile-associated colitis in adults. In Cochrane Database of Systematic Reviews, (John Wiley & Sons, Ltd),.

Pituch, H., Rupnik, M., Obuch-Woszczatyński, P., Grubesic, A., Meisel-Mikołajczyk, F., and Łuczak, M. (2005). Detection of binary-toxin genes (cdtA and cdtB) among Clostridium difficile strains isolated from patients with C. difficile-associated diarrhoea (CDAD) in Poland. J. Med. Microbiol. *54*, 143–147.

Pochapin, M. (2000). The effect of probiotics on Clostridium difficile diarrhea. Am. J. Gastroenterol. *95*, S11–13.

Popoff, M.R., Rubin, E.J., Gill, D.M., and Boquet, P. (1988). Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a Clostridium difficile strain. Infect. Immun. *56*, 2299–2306.

Poulain, B., Stiles, B.G., Popoff, M.R., and Molgo, J. (2006). Chapter 19 - Attack of the nervous system by clostridial toxins: Physical findings, cellular and molecular actions. In The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Third Edition), J.E. Alouf, and M.R. Popoff, eds. (London: Academic Press), pp. 348–389.

Pruitt, R.N., and Lacy, D.B. (2012). Toward a structural understanding of Clostridium difficile toxins A and B. Front. Cell. Infect. Microbiol. *2*.

Rao, A., Jump, R.L.P., Pultz, N.J., Pultz, M.J., and Donskey, C.J. (2006). In vitro killing of nosocomial pathogens by acid and acidified nitrite. Antimicrob. Agents Chemother. *50*, 3901–3904.

Raza, S., Baig, M., Russell, H., Gourdet, Y., and Berger, B. (2010). Clostridium Difficile Infection Following Chemotherapy. Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc. *5*, 1–9.

Rea, M.C., Sit, C.S., Clayton, E., O'Connor, P.M., Whittal, R.M., Zheng, J., Vederas, J.C., Ross, R.P., and Hill, C. (2010). Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against Clostridium difficile. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 9352–9357.

Rea, M.C., Alemayehu, D., Casey, P.G., O'Connor, P.M., Lawlor, P.G., Walsh, M., Shanahan, F., Kiely, B., Ross, R.P., and Hill, C. (2014). Bioavailability of the anti-clostridial bacteriocin thuricin CD in gastrointestinal tract. Microbiol. Read. Engl. *160*, 439–445.

Redelings, M.D., Sorvillo, F., and Mascola, L. (2007). Increase in Clostridium difficile-related Mortality Rates, United States, 1999–2004. Emerg. Infect. Dis. *13*, 1417–1419.

Riegler, M., Sedivy, R., Pothoulakis, C., Hamilton, G., Zacherl, J., Bischof, G., Cosentini, E., Feil, W., Schiessel, R., and LaMont, J.T. (1995). Clostridium difficile toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. J. Clin. Invest. *95*, 2004–2011.

Rodriguez-Palacios, A., Stämpfli, H.R., Duffield, T., Peregrine, A.S., Trotz-Williams, L.A., Arroyo, L.G., Brazier, J.S., and Weese, J.S. (2006). Clostridium difficile PCR ribotypes in calves, Canada. Emerg. Infect. Dis. *12*, 1730–1736.

Rupnik, M., Grabnar, M., and Geric, B. (2003). Binary toxin producing Clostridium difficile strains. Anaerobe *9*, 289–294.

Rupnik, M. (2007). Is Clostridium difficile-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? Clin. Microbiol. Infect. *13*, 457–459.

Rupnik, M., Wilcox, M.H., and Gerding, D.N. (2009). Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat. Rev. Microbiol. *7*, 526–536.

Sambol, S.P., Merrigan, M.M., Lyerly, D., Gerding, D.N., and Johnson, S. (2000). Toxin gene analysis of a variant strain of Clostridium difficile that causes human clinical disease. Infect. Immun. *68*, 5480–5487.

Savariau-Lacomme, M.-P., Lebarbier, C., Karjalainen, T., Collignon, A., and Janoir, C. (2003). Transcription and Analysis of Polymorphism in a Cluster of Genes Encoding Surface-Associated Proteins of Clostridium difficile. J. Bacteriol. *185*, 4461–4470.

Savidge, T.C., Pan, W.-H., Newman, P., O'brien, M., Anton, P.M., and Pothoulakis, C. (2003). Clostridium difficile toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. Gastroenterology *125*, 413–420.

Sayedy, L., Kothari, D., and Richards, R.J. (2010). Toxic megacolon associated Clostridium difficile colitis. World J. Gastrointest. Endosc. *2*, 293–297.

Sebaihia, M., Wren, B.W., Mullany, P., Fairweather, N.F., Minton, N., Stabler, R., Thomson, N.R., Roberts, A.P., Cerdeño-Tárraga, A.M., Wang, H., et al. (2006). The multidrug-resistant human pathogen Clostridium difficile has a highly mobile, mosaic genome. Nat. Genet. *38*, 779–786.

Shannon-Lowe, J., Matheson, N.J., Cooke, F.J., and Aliyu, S.H. (2010). Prevention and medical management of Clostridium difficile infection. BMJ *340*, c1296–c1296.

Shin, B.-M., Kuak, E.Y., Yoo, S.J., Shin, W.C., and Yoo, H.M. (2008). Emerging toxin A-B+ variant strain of Clostridium difficile responsible for pseudomembranous colitis at a tertiary care hospital in Korea. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. *60*, 333–337.

Simor, A.E., Bradley, S.F., Strausbaugh, L.J., Crossley, K., Nicolle, L.E., and SHEA Long-Term-Care Committee (2002). Clostridium difficile in long-term-care facilities for the elderly. Infect. Control Hosp. Epidemiol. Off. J. Soc. Hosp. Epidemiol. Am. *23*, 696–703.

Sloan, L.M., Duresko, B.J., Gustafson, D.R., and Rosenblatt, J.E. (2008). Comparison of Real-Time PCR for Detection of the tcdC Gene with Four Toxin Immunoassays and Culture in Diagnosis of Clostridium difficile Infection. J. Clin. Microbiol. *46*, 1996–2001.

Snydman, D.R. (2008). The Safety of Probiotics. Clin. Infect. Dis. *46*, S104–S111.

Snydman, D.R., Jacobus, N.V., and McDermott, L.A. (2012). Activity of a Novel Cyclic Lipopeptide, CB-183,315, against Resistant Clostridium difficile and Other Gram-Positive Aerobic and Anaerobic Intestinal Pathogens. Antimicrob. Agents Chemother. *56*, 3448–3452.

Sohn, S., Climo, M., Diekema, D., Fraser, V., Herwaldt, L., Marino, S., Noskin, G., Perl, T., Song, X., Tokars, J., et al. (2005). Varying rates of Clostridium difficile-associated diarrhea at prevention epicenter hospitals. Infect. Control Hosp. Epidemiol. Off. J. Soc. Hosp. Epidemiol. Am. *26*, 676–679.

Songer, J.G., and Anderson, M.A. (2006). Clostridium difficile: an important pathogen of food animals. Anaerobe *12*, 1–4.

Songer, J.G. (2010). Clostridia as agents of zoonotic disease. Vet. Microbiol. *140*, 399–404.

Spigaglia, P., Barbanti, F., and Mastrantonio, P. (2011). Surface Layer Protein A Variant of *Clostridium difficile* PCR-Ribotype 027. Emerg. Infect. Dis. *17*, 317–319.

Stabler, R.A., Gerding, D.N., Songer, J.G., Drudy, D., Brazier, J.S., Trinh, H.T., Witney, A.A., Hinds, J., and Wren, B.W. (2006). Comparative Phylogenomics of Clostridium difficile Reveals Clade Specificity and Microevolution of Hypervirulent Strains. J. Bacteriol. *188*, 7297–7305.

Stabler, R.A., Dawson, L.F., Phua, L.T.H., and Wren, B.W. (2008). Comparative analysis of BI/NAP1/027 hypervirulent strains reveals novel toxin B-encoding gene (tcdB) sequences. J. Med. Microbiol. *57*, 771–775.

Stabler, R.A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T.D., Sebaihia, M., Quail, M.A., Rose, G., et al. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of Clostridium difficile 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. Genome Biol. *10*, R102.

Stackebrandt, E., Kramer, I., Swiderski, J., and Hippe, H. (1999). Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus Clostridium. FEMS Immunol. Med. Microbiol. *24*, 253–258.

Steele, J., Feng, H., Parry, N., and Tzipori, S. (2010). Piglet models of acute or chronic Clostridium difficile illness. J. Infect. Dis. *201*, 428–434.

Stewart, D.B., Berg, A., and Hegarty, J. (2013). Predicting recurrence of C. difficile colitis using bacterial virulence factors: binary toxin is the key. J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract *17*, 118–124; discussion p.124–125.

Stiles, B.G., Wigelsworth, D.J., Popoff, M.R., and Barth, H. (2011). Clostridial binary toxins: iota and C2 family portraits. Front. Cell. Infect. Microbiol. *1*, 11.

Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B., and Popoff, M. (2000). Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin)

by strains of Clostridium difficile. FEMS Microbiol. Lett. *186*, 307–312.

Tamma, P.D., and Sandora, T.J. (2012). Clostridium difficile Infection in Children: Current State and Unanswered Questions. J. Pediatr. Infect. Dis. Soc. *1*, 230–243.

Tan, K.S., Wee, B.Y., and Song, K.P. (2001). Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of Clostridium difficile. J. Med. Microbiol. *50*, 613–619.

Tanaka, K., Ishihara, A., and Nakajima, H. (2014). Isolation of anteiso-C17, iso-C17, iso-C16, and iso-C15 bacillomycin D from Bacillus amyloliquefaciens SD-32 and their antifungal activities against plant pathogens. J. Agric. Food Chem. *62*, 1469–1476.

Tang, J.-S., Zhao, F., Gao, H., Dai, Y., Yao, Z.-H., Hong, K., Li, J., Ye, W.-C., and Yao, X.-S. (2010). Characterization and Online Detection of Surfactin Isomers Based on HPLC-MSn Analyses and Their Inhibitory Effects on the Overproduction of Nitric Oxide and the Release of TNF-? and IL-6 in LPS-Induced Macrophages. Mar. Drugs *8*, 2605–2618.

Tasteyre, A., Barc, M.C., Karjalainen, T., Dodson, P., Hyde, S., Bourlioux, P., and Borriello, P. (2000). A Clostridium difficile gene encoding flagellin. Microbiol. Read. Engl. *146 (Pt 4)*, 957–966.

Tasteyre, A., Barc, M.C., Collignon, A., Boureau, H., and Karjalainen, T. (2001). Role of FliC and FliD flagellar proteins of Clostridium difficile in adherence and gut colonization. Infect. Immun. *69*, 7937–7940.

Tasteyre, A., Barc, M.-C., Karjalainen, T., Bourlioux, P., and Collignon, A. (2002). Inhibition of in vitro cell adherence of Clostridium difficile by Saccharomyces boulardii. Microb. Pathog. *32*, 219–225.

Taylor, N.S., and Bartlett, J.G. (1980). Binding of Clostridium difficile Cytotoxin and Vancomycin by Anion-Exchange Resins. J. Infect. Dis. *141*, 92–97.

Thelestam, M., and Frisan, T. (2006). Chapter 23 - Cytolethal distending toxins. In The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Third Edition), J.E. Alouf, and M.R. Popoff, eds. (London: Academic Press), pp. 448–467.

Tvede, M., and Rask-Madsen, J. (1989). Bacteriotherapy for chronic relapsing Clostridium difficile diarrhoea in six patients. Lancet *1*, 1156–1160.

Varray, S., Aubagnac, J.-L., Lamaty, F., Lazaro, R., Martinez, J., and Enjalbal, C. (2000). Poly(ethyleneglycol) in electrospray ionization (ESI) mass spectrometry. Analusis *28*, 263–268.

Viscidi, R., Willey, S., and Bartlett, J.G. (1981). Isolation rates and toxigenic potential of Clostridium difficile isolates from various patient populations. Gastroenterology *81*, 5–9.

Viseur, N., and Lambert, M.-L. (2012). Epidemiologie van Clostridium difficile -infecties in België (Weten schappelijk Instituut Volksgezondheid).

Vonberg, R.-P., Reichardt, C., Behnke, M., Schwab, F., Zindler, S., and Gastmeier, P. (2008a). Costs of nosocomial Clostridium difficile-associated diarrhoea. J. Hosp. Infect. *70*, 15–20.

Vonberg, R.-P., Kuijper, E.J., Wilcox, M.H., Barbut, F., Tüll, P., Gastmeier, P., European C difficile-Infection Control Group, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), van den Broek, P.J., Colville, A., et al. (2008b). Infection control measures to limit the spread of Clostridium difficile. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *14 Suppl 5*, 2–20.

Voth, D.E., and Ballard, J.D. (2005). Clostridium difficile Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. Clin. Microbiol. Rev. *18*, 247–263.

Waligora, A.-J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A., and Karjalainen, T. (2001). Characterization of a Cell Surface Protein of Clostridium difficile with Adhesive Properties. Infect. Immun. *69*, 2144–2153.

Waller, A.S., Paillot, R., and Timoney, J.F. (2011). Streptococcus equi: a pathogen restricted to one host. J. Med. Microbiol. *60*, 1231–1240.

Walter, J. (2008). Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. Appl. Environ. Microbiol. *74*, 4985–4996.

Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E., and McDonald, L.C. (2005). Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet *366*, 1079–1084.

Weese, J. s., Reid-Smith, R. j., Avery, B. p., and Rousseau, J. (2010). Detection and characterization of Clostridium difficile in retail chicken. Lett. Appl. Microbiol. *50*, 362–365.

Weiss, K. (2009). Toxin-binding treatment for Clostridium difficile: a review including reports of studies with tolevamer. Int. J. Antimicrob. Agents *33*, 4–7.

Wenisch, C., Parschalk, B., Hasenhündl, M., Hirschl, A.M., and Graninger, W. (1996). Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhea. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *22*, 813–818.

Wilcox, M.H., and Fawley, W.N. (2000). Hospital disinfectants and spore formation by Clostridium difficile. Lancet *356*, 1324.

Wilcox, M.H., Freeman, J., Fawley, W., MacKinlay, S., Brown, A., Donaldson, K., and Corrado, O. (2004). Long-term surveillance of cefotaxime and piperacillin-tazobactam prescribing and incidence of Clostridium difficile diarrhoea. J. Antimicrob. Chemother. *54*, 168–172.

Wilcox, M.H. (2007). Diagnosis of Clostridium difficile–Associated Diarrhea and Odor. Clin. Infect. Dis. *45*, 1110–1110.

Wilson, K.H., Sheagren, J.N., and Freter, R. (1985). Population dynamics of ingested Clostridium difficile in the gastrointestinal tract of the Syrian hamster. J. Infect. Dis. *151*, 355–361.

Wilson, K.H. (1993). The microecology of Clostridium difficile. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *16 Suppl 4*, S214–218.

Wingfield, P. (2001). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. In Current Protocols in Protein Science, (John Wiley & Sons, Inc.),.

Wright, A., Wait, R., Begum, S., Crossett, B., Nagy, J., Brown, K., and Fairweather, N. (2005). Proteomic analysis of cell surface proteins from Clostridium difficile. Proteomics *5*, 2443–2452.

Wu, Z.-J., DU, X., and Zheng, J. (2013). Role of Lactobacillus in the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized controlled trials. Chin. Med. J. (Engl.) *126*, 4154–4161.

Wullt, M., Hagslätt, M.-L.J., and Odenholt, I. (2003). Lactobacillus plantarum 299v for the treatment of recurrent Clostridium difficile-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. Scand. J. Infect. Dis. *35*, 365–367.

Young, G.P., Ward, P.B., Bayley, N., Gordon, D., Higgins, G., Trapani, J.A., McDonald, M.I., Labrooy, J., and Hecker, R. (1985). Antibiotic-associated colitis due to Clostridium difficile: double-blind comparison of vancomycin with bacitracin. Gastroenterology *89*, 1038–1045.

Youssef, Grant, and Peiris (2012). Vitamin D deficiency: A potential risk factor for Clostridium difficile infection. Risk Manag. Healthc. Policy 115.

Zar, F.A., Bakkanagari, S.R., Moorthi, K.M.L.S.T., and Davis, M.B. (2007). A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhea, stratified by disease severity. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *45*, 302–307.

Zhao, P., Quan, C., Jin, L., Wang, L., Guo, X., and Fan, S. (2013). Sequence characterization and computational analysis of the non-ribosomal peptide synthetases controlling biosynthesis of lipopeptides, fengycins and bacillomycin D, from Bacillus amyloliquefaciens Q-426. Biotechnol. Lett. *35*, 2155–2163.

Zuger, A.M.D. (2013). A New Approach to Clostridium difficile. NEJM J. Watch *2013*.

7. ADDENDUM

7.1 BACTERIEËLE MEDIA

7.1.1 VLOEIBARE MEDIA

BHI BROTH

Het vloeibare medium is aangemaakt met 52 g/l *Brain Heart Broth* (BHI)(Merck KGaA 110493) en AD. Het BHI medium bevat 27,5 g/l nutriënt substraat, 2 g/l D(+)-glucose, 5 g/l NaCl en 2,5 g/l Na_2HPO_4. De broth werd geautoclaveerd alvorens gebruik. Voor de mediaoptimalisatie van CP38 (Paragraaf 5.4.1) werd aan het BHI medium 6 g/l D(+)-fructose en 0,001 g/l L-cysteïne hydrochloride (L-cys-HCl) toegevoegd. L-cys-HCl werkt als reducerend middel om het medium anaeroob te maken. Het medium werd geautoclaveerd voor gebruik.

CDB

Het vloeibaar *Clostridium difficile* medium (CDB, CDB1) bestaat uit, 40 g/l proteose pepton; 5 g/l Na_2HPO_4; 1 g/l KH_2PO_4; 0,1 g/l $MgSO_4$; 2 g/l NaCl; 6 g/l fructose, 0,001% v/v L-cys-HCl en AD. Er werden vier varianten op het CDB medium aangemaakt (CDB2, CDB3, CDB4 en CDB5) waarbij de concentratie aan proteose pepton telkens werd verlaagd (30 g/l, 20 g/l, 10 g/l en 5 g/l). De zoutconcentratie dient hiervoor evenredig verhoogd te worden (2,6 g/l, 3,4 g/l, 4,2 g/l en 4,6 g/l). De media werden geautoclaveerd alvorens gebruik.

MOLP

Het medium geoptimaliseerd voor lipopeptideproductie (MOLP) bevat, 22,43 g/l sucrose; 0,1% L-cysteïne; 5 g/l Na_2HPO_4; 2,781 g/l NH_4Cl; 3,5 g/l KH_2PO_4; 1,89 mg/l $FeSO_4.7H_2O$; 3,38 mg/l $MnSO_4.H_2O$; 10,84 mg/l $ZnSO_4.7H_2O$; 49,30 mg/l $MgSO_4.7H_2O$; 0,5 g/l gist extract en AD. Het medium werd geautoclaveerd alvorens gebruik.

MRS

De broth bestaat uit 52 g/l *de Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) Broth (Oxoid CM0359) en AD. Het medium werd geautoclaveerd alvorens gebruik.

RCM

Het medium werd aangemaakt met 38 g/l *Reinforced Clostridial Medium* (RCM)(Oxoid, CM0149) en AD. Het medium werd geautoclaveerd alvorens gebruik.

TSB

Tryptone soya broth (TSB) werd gemaakt met 30 g/l *Trypton Soya Broth* (Oxoid CM1065), 0,1% L-cys-HCl en AD. Het medium werd geautoclaveerd alvorens gebruik.

7.1.2 VASTE MEDIA

BHI AGAR

De BHI agar bestaat uit 52 g/l BHI (Merck KGaA 110493), 1% *Agar Bacteriological* (agar nr. 1; Oxoid LP0011) en AD. De agar werd geautoclaveerd. Hierna werd de agar terug opkookt en afgekoeld tot 56°C worden alvorens gebruik.

CDA

Van het *Clostridium difficile Agar Base* (CDA)(Oxoid CM0601) medium werd 49 g/l CDA, 0,1% L-cys-HCl en AD gebruikt. De agar werd opgekookt en geautoclaveerd. Hierna werd de agar terug opkookt en afgekoeld tot 56°C worden alvorens gebruik.

MRSA

De agar bestaat uit 62 g/l MRS Agar (MRSA)(Oxoid CM0361), 0,003% v/v Tween 80 en AD. De agar werd opgekookt en geautoclaveerd. Hierna werd de agar terug opkookt en afgekoeld tot 56°C worden alvorens gebruik.

RCA

De agar werd aangemaakt met 38 g/l RCM, 1% *Agar Bacteriological* (agar nr. 1; Oxoid LP0011) en AD. Het medium werd opgekookt en geautoclaveerd. Hierna werd het medium terug opgekookt en afgekoeld tot 56°C alvorens gebruik.

7.2 PROTOCOLS

TITRATIETEST

Het supernatans werd in tienvoud verdund (10^{0} – 10^{-7} in $HBSS^{-}$). Van elke verdunning werden zes druppels van 20 µl werden getitreerd op vierkante platen BHI voor BA of op RCA platen voor CP38. De CFU werd geteld na 24 u incubatie bij respectievelijk 30°C of anaeroob bij 37°C.

De kolonies werden berekend in CFU/ml als volgt: X aantal kolonies in 120 µl (6 maal 20 µl op medium gedruppeld) bij 10^{-Y} verdunning => X*50/6 aantal kolonies in 1 ml bij 10^{-Y} verdunning => $X*50/6*10^{(Y+2)}$ kolonies in 1 ml.

AGAR WELL DIFFUSIETEST

Een CDVPI cultuur werd anaeroob opgegroeid in RCM media (24u, 37°C). Na de cultuur 50 maal te verdunnen in RCA media, werd 40 ml/vierkante plaat gegoten. Na drogen van de platen werden wells in de agar gemaakt en telkens 50 µl van de te testen stalen geladen. Na overnacht incubatie bij 37°C werd de inhibitie van CDVPI groei gemeten a.d.h.v. een inhibitiezone (in mm diameter).

SDS-PAGE EN COOMASSIE BRILLIANT BLUE

Van elk staal werd 20 µl toegevoegd aan 5 µl ladingsbuffer. De ladingsbuffer (5 x) bevat 3,25 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8), 4 ml β-mercaptoethanol, 10 ml glycerol, 2 g SDS en broomfenolblauw en werd aangelengd tot 20 ml met AD. Elk staal werd in aanwezigheid van de ladingsbuffer 5 minuten opgekookt. De stalen werden gedurende 1 uur gescheiden bij 100 V op een 12% acrylamidegel (*running gel*, 1,7 ml AD; 1,25 ml Tris 1,5 M pH 8,8; 2 ml 30% acrylamide; 50 µl 10% SDS; 50 µL 10% APS; 5 µl TEMED; *stacking gel*, 3,05 ml AD; 1,25 ml Tris 0,5 M pH 6,8; 650 µl 30% acrylamide; 50 µl 10% SDS; 50 µL 10% APS; 10 µl TEMED) in *running buffer* (14,4 g/l glycine; 3 g/l Tris base; 1 g/l SDS; aanlengen tot 1 l met AD). Tevens werd een eiwitladder meegelopen (Pageruler Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific). De eiwitten werden gevisualiseerd met een Coomassie Brilliant Blue kleuring (Brilliant Blue G Concentrate, Sigma-Aldrich) en gescand (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad Laboratories).

7.3 RESULTATEN

Tabel 7.1 Rauwe data: karakterisatie AMC van *B. amyloliquefaciens.*

MAXIMALE PRODUCTIE AMC

Set 1	**OD (600 nm)**						**Activiteit (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)**					
Uur	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,004	0,031	0,005	0,176	0,204	0	0	0	0	0	0	0
4	0,015	0,039	0,015	0,187	0,215	0,015	0	0	0	0	0	0
6	0,141	0,115	0,37	0,299	0,339	0,134	0	0	0	0	0	0
8	0,46	0,337	0,449	0,562	0,641	0,447	0	0	0	0	0	0
10	0,674	0,713	0,771	0,796	0,965	0,733	10	13	12	13	12	14
12	0,787	0,798	0,833	0,911	1,073	0,801	13	15	14	16	15	16
24	0,709	0,943	0,696	0,804	0,777	0,682	13	14	14	15	14	15
36	0,526	0,81	0,478	0,69	0,694	0,519	14	15	14	14	15	16
50	0,38	0,66	0,385	0,57	0,523	0,352	16	15	16	15	15	16
58	0,337	0,509	0,281	0,282	0,283	0,298						
	CFU											
Uur	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
0	30	27	14	11	19	35	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}
4	26	66	12	63	65	44	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
8	68	47	39	13	13	12	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
12	48	31	30	11	79	101	10^{-4}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}
24	75	66	69	33	30	51	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}
36	29	26	22	54	19	>200	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-3}
50	10	18	6	38	5	10	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-7}
72	8	17	12	16	7	9	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-6}

Set 2	**OD (600 nm)**						**Activiteit (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)**					
Uur	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
12	0,165	0,26	0,579	0,791	0,858	0,589	0	0	14	16	14	16
14	0,482	0,598	0,705	0,905	0,976	0,708	13	12	18	16	16	17
16	0,642	0,693	0,763	0,966	1,063	0,779	14	17	18	19	18	19
18	0,774	0,795	0,853	1,061	1,152	0,878	16	18	19	20	18	19
20	0,892	0,861	0,875	1,069	1,152	0,878	18	20	18	18	17	17
22	0,98	0,959	0,788	0,988	1,028	0,777	19	19	17	18	17	17
24	0,877	0,779	0,655	0,897	0,906	0,656	17	17	17	18	18	17
38	0,387	1,873	0,384	0,764	0,679	0,311	18	17	18	18	18	17
46	0,373	0,33	0,353	0,384	0,422	0,386						
	CFU											
Uur	A1	A2	B1	B2	C1	C2	A1	A2	B1	B2	C1	C2
12	72	73	>200	>200	>200	37	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}
16	25	31	32	26	64	18	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}
20	14	25	14	15	17	18	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}
24	17	13	51	10	19	46	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}

38	23	4	13	9	60	14	10^{-5}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-6}
46	130	66	150	10	35	45	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}

INVLOED VAN PH OP BA SN ACTIVITEIT

Pellet (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)

2	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
14	14	14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	15	13	8	0	0	0	0	0	0	0
18	18	18	14	0	0	0	0	0	0	0
10	10	8	0	0	0	0	0	0	0	0
10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0

SN (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)

2	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
0	10	14	16	18	18	16	16	16	16	16
8	10	13	16	17	17	17	17	16	16	16
0	0	10	16	18	20	19	19	19	19	19
0	0	8	8	10	10	10	10	10	10	10
0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10
0	0	12	12	12	12	12	12	12	12	10
0	0	10	12	12	12	12	12	12	12	12

INVLOED VAN TEMPERATUUR OP BA SN ACTIVITEIT

Temperatuur (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)

25	**40**	**50**	**60**	**70**	**80**	**90**	**100**	**110**	**120**
24	24	24	24	24	24	24	22	22	20
24	24	24	24	24	24	24	22	20	20
24	24	24	24	24	22	22	22	22	22

INVLOED VAN PROTEASEN OP BA SN ACTIVITEIT

1 u (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)

-	**Pepsine**	**Proteinase P**	**Proteinase K**	**Trypsine**	**Chymotrypsine**	**Pronase**
26	26	24	24	24	24	24
26	24	24	24	24	22	22
24	24	24	24	24	24	24

24 u (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)

-	**Pepsine**	**Proteinase P**	**Proteinase K**	**Trypsine**	**Chymotrypsine**	**Pronase**
26	24	20	20	22	10	20
24	24	20	18	22	20	20
24	22	18	20	22	12	20

EFFECT VAN BA SN OP DARMCELLEN *IN VITRO*

OD (550 nm)

0,046	0,322	0,046	0,243	0,32	0,283	0,046	0,334	0,06	0,372	0,314	0,117

0,054	0,669	0,094	0,453	0,698	0,941	0,644	0,819	0,637	0,919	0,551	0,096
0,049	0,599	0,164	0,408	0,726	0,604	0,692	0,692	0,604	0,558	0,586	0,276
0,068	0,731	0,278	0,516	0,851	0,833	0,887	0,928	0,556	0,804	0,565	0,09
0,08	0,958	0,465	0,585	0,965	0,97	0,585	0,754	0,585	0,783	0,487	0,118
0,381	0,628	0,457	0,554	0,7	0,675	0,828	0,713	0,576	0,735	0,542	0,173
0,061	0,644	0,198	0,124	0,198	0,487	0,681	0,75	0,497	0,869	0,737	0,102
0,078	0,176	0,249	0,106	0,175	0,049	0,297	0,252	0,067	0,334	0,107	0,337

0,068	0,235	0,046	0,06	0,06	0,286	0,062	0,062	0,175	0,376	0,394	0,194
0,06	0,573	0,153	0,365	0,615	0,582	0,818	0,549	0,425	0,381	0,481	0,193
0,049	0,624	0,137	0,424	0,655	0,612	0,629	0,587	0,492	0,73	0,474	0,049
0,064	0,729	0,236	0,441	0,667	0,655	0,756	0,658	0,547	0,539	0,5	0,057
0,068	0,673	0,455	0,596	0,931	0,656	0,694	0,67	0,701	0,725	0,553	0,075
0,065	0,663	0,501	0,605	0,735	0,645	0,614	0,635	0,498	0,515	0,475	0,353
0,055	0,908	0,063	0,063	0,071	0,434	0,551	0,591	0,6	0,472	0,391	0,077
0,059	0,225	0,074	0,216	0,083	0,076	0,069	0,086	0,07	0,192	0,18	0,056

0,069	0,376	0,092	0,102	0,099	0,224	0,122	0,078	0,171	0,371	0,065	0,065
0,081	0,611	0,148	0,617	0,521	0,514	0,551	0,804	0,69	0,59	0,445	0,108
0,094	0,491	0,28	0,377	0,756	0,615	0,568	0,634	0,577	0,604	0,516	0,075
0,097	0,662	0,239	0,413	0,573	0,791	0,575	0,58	0,836	0,539	0,538	0,089
0,084	0,563	0,396	0,535	0,734	0,872	0,673	0,58	0,617	0,59	0,486	0,06
0,267	0,4	0,592	0,424	0,472	0,65	0,701	0,481	0,476	0,466	0,406	0,077
0,097	0,401	0,15	0,241	0,067	0,65	0,454	0,585	0,593	0,563	0,483	0,061
0,127	0,121	0,094	0,059	0,205	0,248	0,129	0,045	0,273	0,151	0,374	0,218

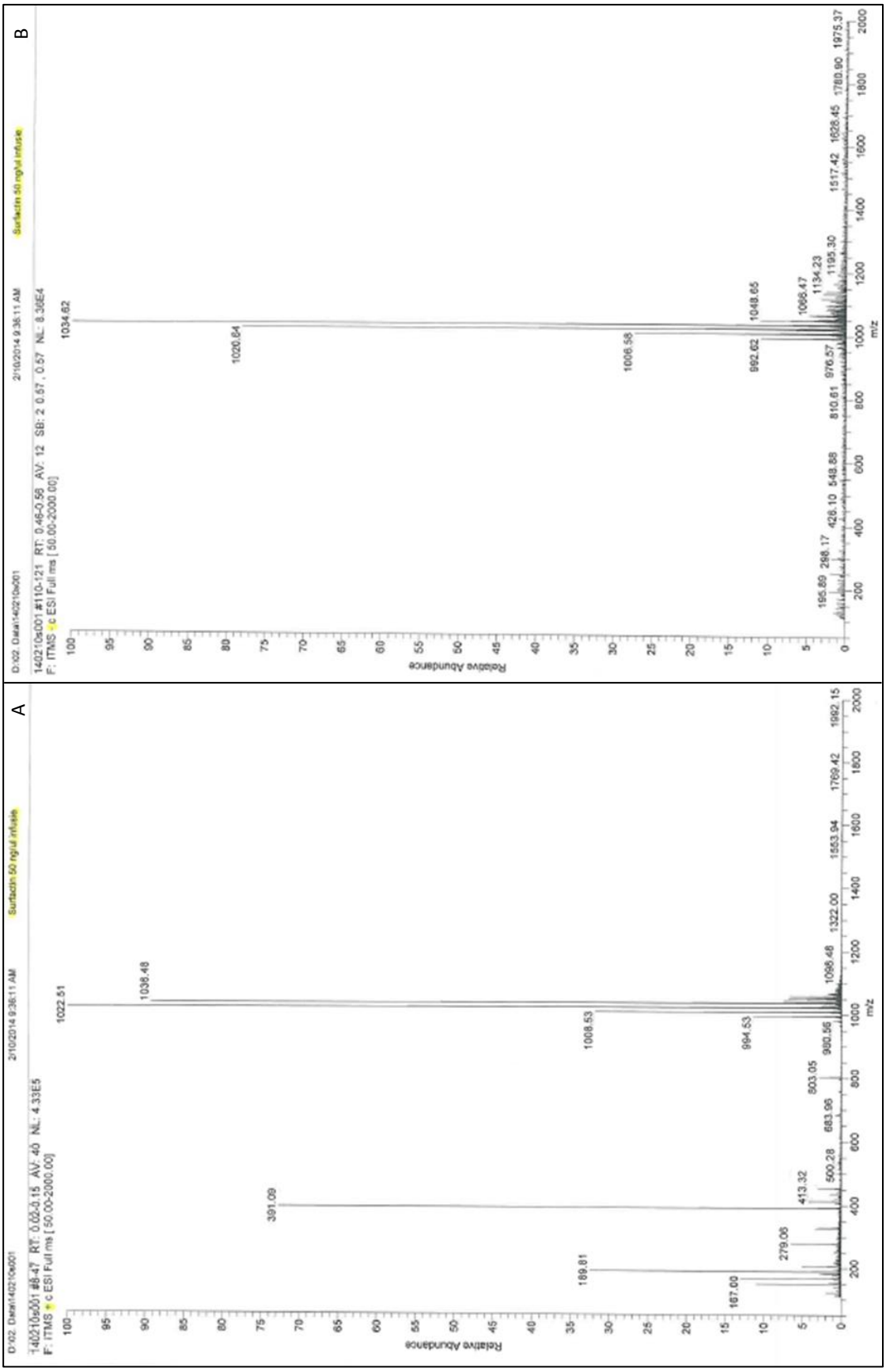
Tabel 7.2 Rauwe data: opzuivering AMC van *B. amyloliquefaciens.*

SPE

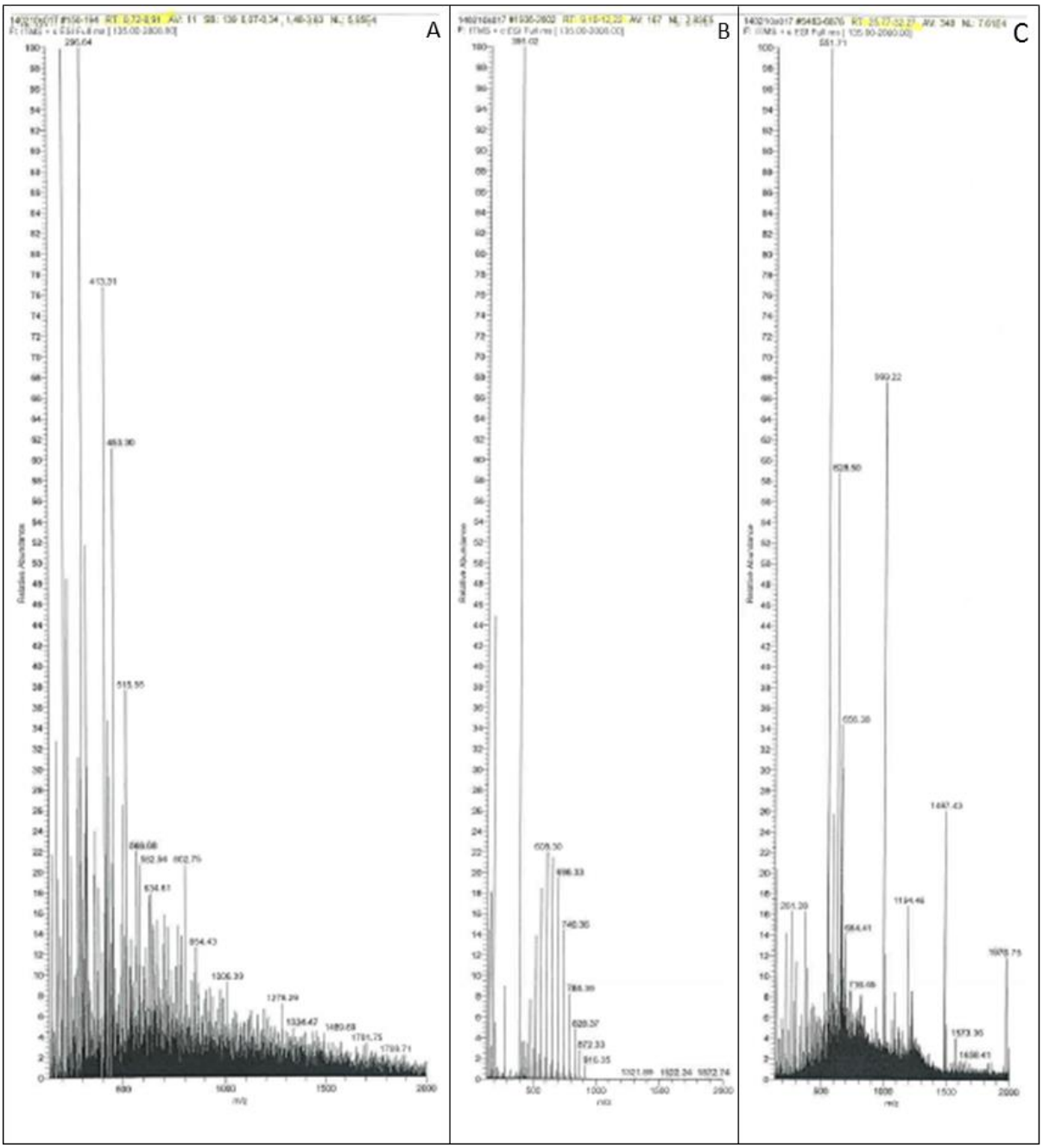
Activiteit (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)			
Staal BA ZP	24	**Was 6**	0
Doorloop	12	**Staal 0**	20
Was 1	20	**Staal 1**	12
Was 2	12	**Staal 2**	10
Was 3	10	**Staal 3**	8
Was 4	0		
Was 5	0		

HPLC

Activiteit (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)			
Staal = W1	20	**F3**	14
E8	11	**F4**	16
E9	12	**F5**	16
E10	19	**F7**	12
E11	26	**F8**	12
E12	24	**F10**	12
F1	18	**Overige fracties**	0



Figuur 7.1 MS spectra van aangekocht surfactine. A) MS spectrum van surfactine in positieve modus. **B)** MS spectrum van surfactine in negatieve modus.



Figuur 7.2 MS spectra van het opgezuiverd actief staal. A) MS spectrum van eerste piekcluster geëlueerd van de HPLC kolom omstreeks 0,91 min. **B)** MS spectrum van tweede piekcluster geëlueerd van de HPLC kolom omstreeks 11,07 min. **C)** MS spectrum van derde piekcluster geëlueerd van de HPLC kolom omstreeks 32,61 min.

Tabel 7.3 Rauwe data: selectiviteit AMC van *B. amyloliquefaciens.* ”-“, geen groei opgetreden; “ “, niet getest.

Nr.	Naam	BA SN (inhibitiezone in mm)						BA ZP (inhibitiezone in mm)					
		A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
	Clostridium difficile VPI	12	16	0	18	16	14	24	30	22	22	24	24
	Aerobe stammen												
1	DNAse negatieve *Staphylococcus* sp. 9970	-	-	-	0	-	0	0	0	12	0	-	0
2	DNAse negatieve *Staphylococcus* sp. 9974	0	0	0	-	0	-	0	0	0	-	0	-
3	*Enterococcus cecorum* 10036	0	0	0	12	12	0	8	16	10	22	22	22
4	*Esscherichia coli* 9975	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	8	12
5	*Esscherichia coli* 9978	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10
6	*Esscherichia coli* 10025	-	-	-	0	0	0	-	-	-	10	10	10
7	*Esscherichia coli* 10046	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	8	10
8	*Esscherichia coli* 10049	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	8	12
9	*Esscherichia coli* 10060				0	0	0	0	0	0	10	8	10
10	*pasteurella sp.*	0	0	-				0	12	12			
11	*pasteurella sp.*	0	-	-				0	14	14			
12	*Pseudomonas aeruginosa* 10003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	12
13	*Pseudomonas aeruginosa* 10025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	*Salmonella enteritidis*	-	-	-	0	0	0	0	0	0	10	0	10
15	*Salmonella typhimrium*	-	-	-	0	0	0	0	0	0	10	0	10
16	*Salmonella* sp. 10005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8
17	*Salmonella* sp. 10015	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	12
18	*Staphylococcus aureus* 10036	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8
19	*Staphylococcus aureus* 10057 (MRSA)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8
20	*Staphylococcus intermedius*	-	-	-	0	0	0	0	0	0	8	8	8
21	*Staphylococcus intermedius* 9970	0	0	0	0	0	0	0	0	12	10	0	10
22	*Staphylococcus intermedius* 9995	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10
23	*Staphylococcus intermedius* 10050	0	0	0	0	0	0	0	0	12	10	0	10
24	*Staphylococcus intermedius* 10052	0	0	0	0	0	0	0	0	10			
25	*Streptococcus bovis* 10091	-	-	-	0	0	0	-	-	-	10	-	-
26	*Streptococcus equi* subsp. *equi* 9969	0	0	0	18	16	14	20	22	18	22	24	24
27	*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* 9999	-	-	-	12	12	0	0	20	20	20	12	16
28	*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* 10038	-	-	-	12	12	0	-	-	-	20	16	16
29	*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* 10072	-	-	-	18	14	0	0	20	16	20	16	22
30	*Trueperella pyogenes* 9950	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	*Trueperella pyogenes* 9972	-	-	-	-	-	-	8	20	18	-	-	-
32	*Trueperella pyogenes* 10048	0	0	0	-	-	-	0	0	0	-	-	-
33	*Trueperella pyogenes* 10078	0	0	0	0	-	-	-	-	-	10	-	-
34	*Yersinia pseudotuberculosis* 10103	-	-	-	14	0	0	0	16	0	20	0	18
35	*Yersinia pseudotuberculosis* 10105	-	-	-	12	10	0	0	12	0	22	20	20

	Anaerobe stammen							
1	*Lactobacillus acidophilus*	0	0	0		12	12	18
2	*Lactobacillus bifermentans*	-	-	-		-	-	-
3	*Lactobacillus brevis*	0	0	0		20	20	22
4	*Lactobacillus buchneri*	0	0	0		12	12	12
5	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*	-	-	-		-	-	-
6	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis*	-	-	-		-	-	-
7	*Lactobacillus fructivorans*	-	-	-		-	-	-
8	*Lactobacillus gasseri*	-	-	-		-	-	-
9	*Lactobacillus helveticus*	-	-	-		-	-	-
10	*Lactobacillus intestinalis*	-	-	-		-	-	-
11	*Lactobacillus johnsonni*	-	-	-		-	-	-
12	*Lactobacillus paracasei*	0	0	0		0	0	0
13	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	0	0	0		20	20	20
14	*Lactobacillus plantarum*	12	0	12		12	-	14
15	*Lactobacillus rhamnosus*	-	-	-		14	14	14
16	*Lactobacillus sake carnosus*	-	0	0		12	14	14
17	*Lactobacillus salivarius*	0	0	0		20	10	22

Tabel 7.4 Rauwe data: antibacteriële activiteit van *C. perfringens.*

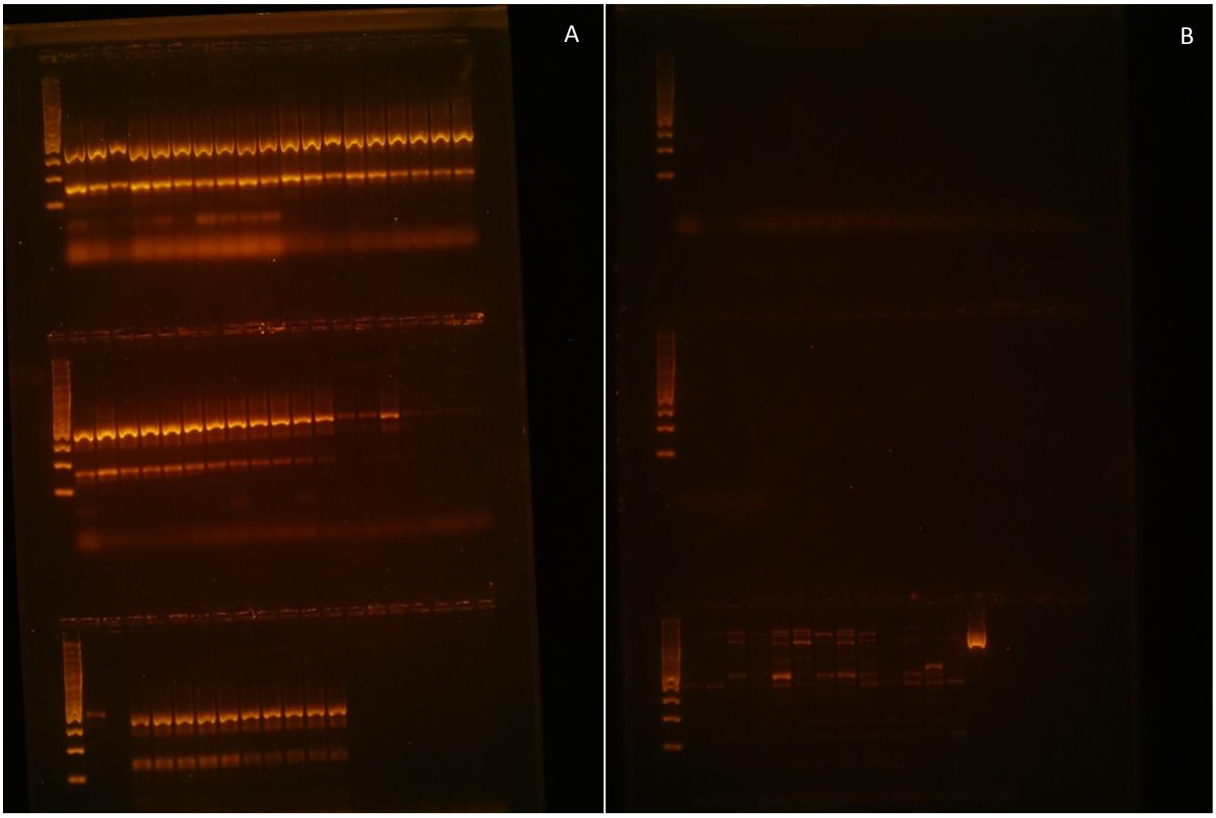
CFU (aantal kolonies gemeten bij verdunning)			**Activiteit (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)**	
BHI	18	10^{-7}	Vivaspin (10x)	13
CDB1	38	10^{-7}	Ammoniumsulfaat (50x)	10
CDB2	40	10^{-7}		
CDB3	19	10^{-7}		
CDB4	21	10^{-6}		
CDB5	14	10^{-4}		

Activiteit (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)

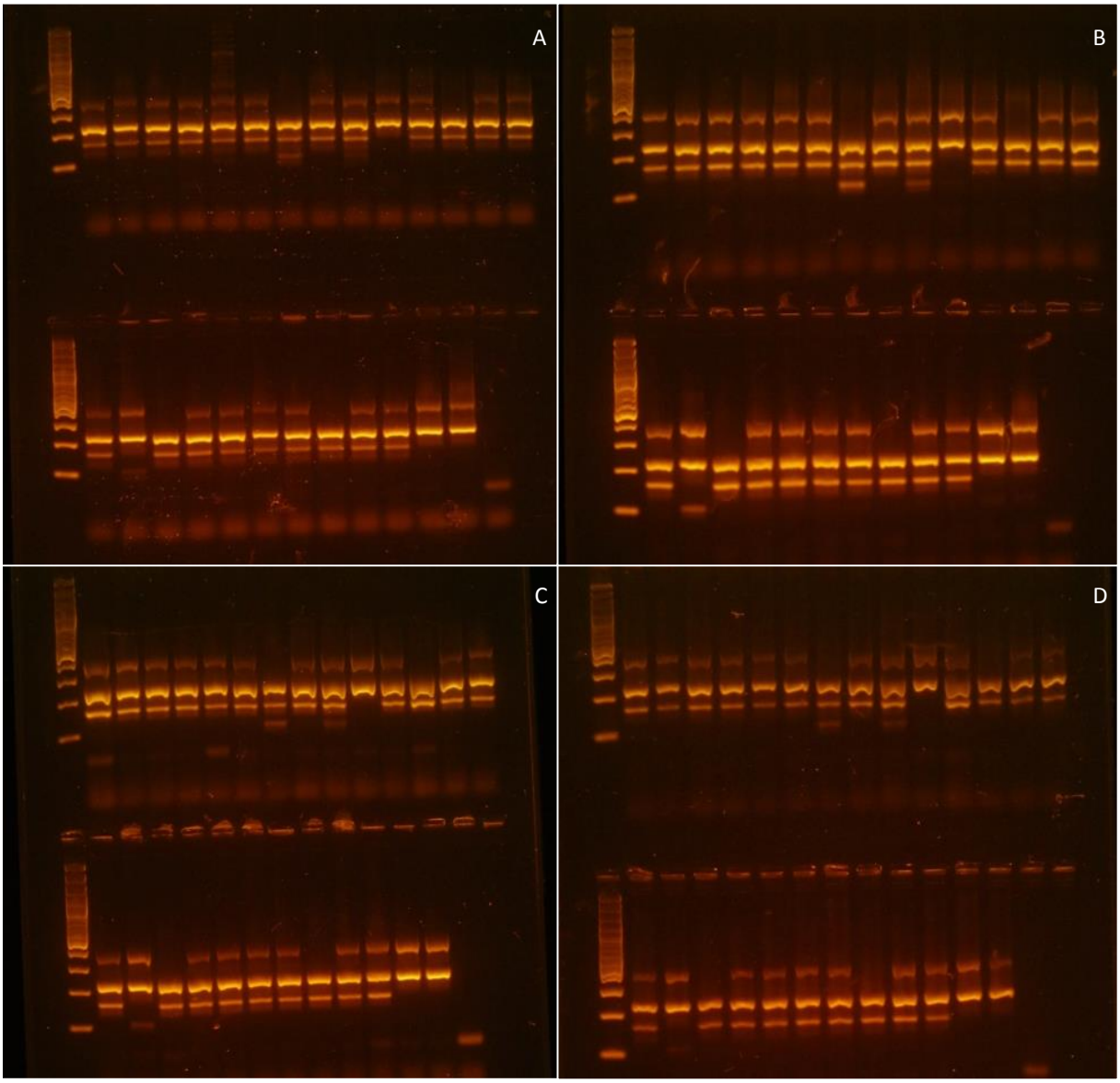
	2^{0}	2^{-1}	2^{-2}	2^{-3}	2^{-4}	2^{-5}	2^{-6}
BHI	0	0	0	0	0	0	0
CDB1	2	2	1	0	0	0	0
CDB2	2	2	1	0	0	0	0
CDB3	1	1	0	0	0	0	0
CDB4	0	0	0	0	0	0	0
CDB5	0	0	0	0	0	0	0

Activiteit (inhibitiezone t.o.v. CDVPI in mm)

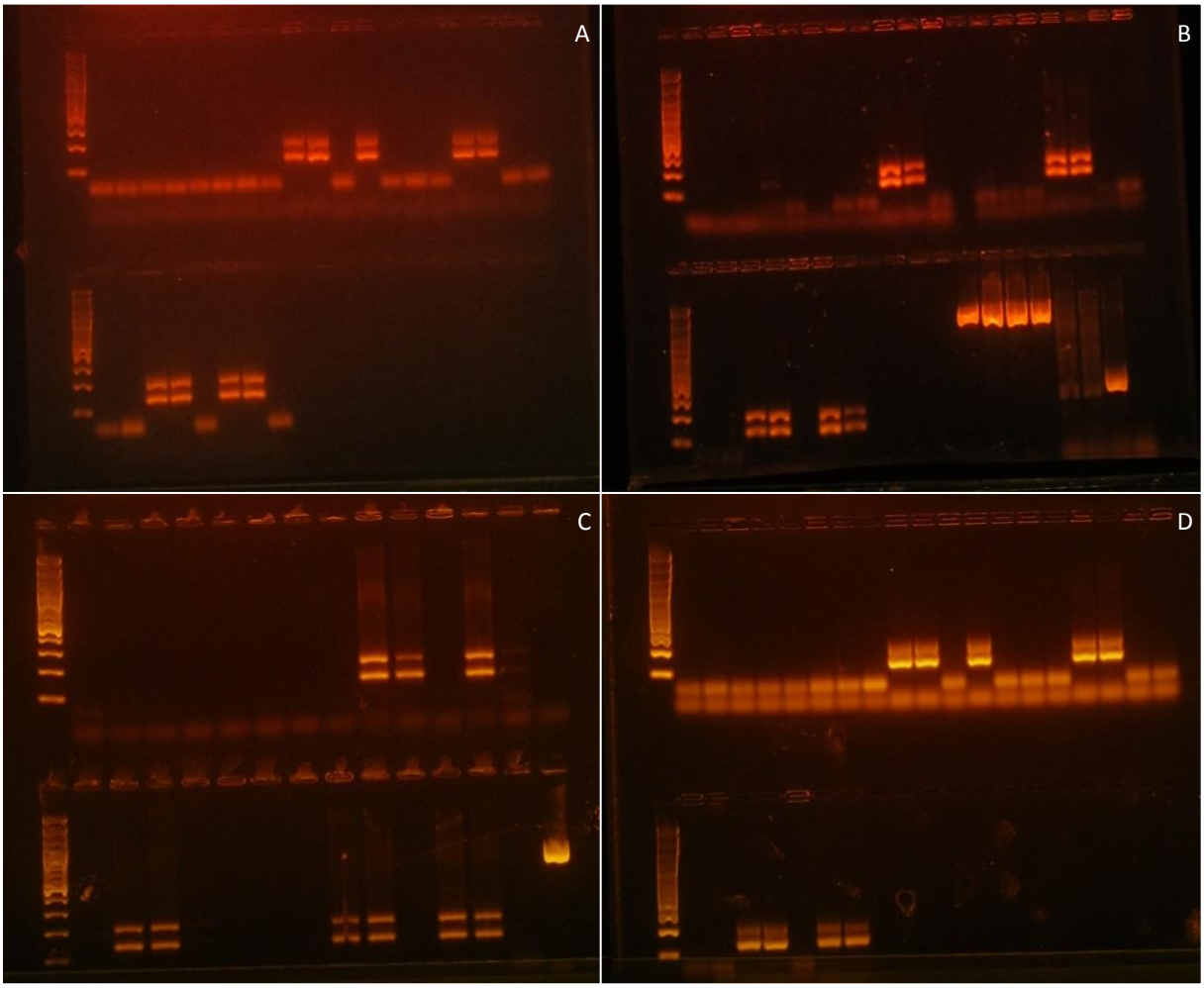
Anion-uitwisselingschromatografie		kation-uitwisselingschromatografie	
CP38 SN	10	Startstaal = Doorloop anion	10
Doorloop	10	Doorloop	12
Was 1	10	Was 1	12
Was 2	0	Was 2	12
Staal 0	0	Staal 0	12
Staal 1	0	Staal 1	10
Staal 2	0	Staal 2	0



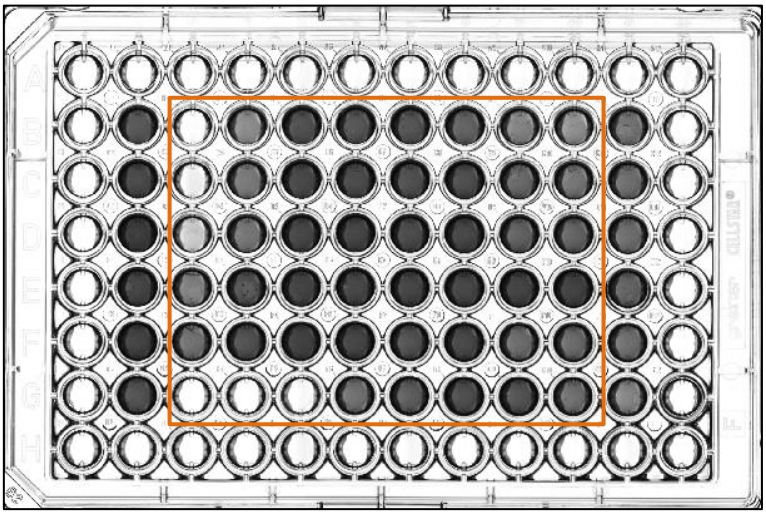
Figuur 7.3 Optimalisatie PCR van toxine A en toxine B. De vijf CD stammen BR001, BR002, BR003, BR012, BR014 werden achtereenvolgens bestudeerd. 1e laan is telkens GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp). **A) Bovenste gel**; laan 2 – 6, primerconcentratie set 1 met 10x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water; laan 7 – 11, primerconcentratie set 1 met 100x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water; laan 12 – 16, primerconcentratie set 2 met 10x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water; laan 17 – 20, primerconcentratie set 2 met 100x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water. **Middelste gel**; laan 2, primerconcentratie set 2 met 100x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water; laan 3 – 7, primerconcentratie set 3 met 10x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water; laan 8 – 12, primerconcentratie set 3 met 100x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water; laan 13 – 17, primerconcentratie set 4 met 10x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water; laan 18 – 20, primerconcentratie set 4 met 100x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water. **Onderste gel**; laan 2 – 3, primerconcentratie set 4 met 100x verdund DNA aangelengd in RNAse vrij water; laan 4 – 8, primerconcentratie set 1 met 10x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol; laan 9 – 13, primerconcentratie set 1 met 100x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol; laan 14 – 18, primerconcentratie set 2 met 10x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol; laan 19 – 20, primerconcentratie set 2 met 100x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol. **B) Bovenste gel**; laan 2 – 4, primerconcentratie set 2 met 100x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol; laan 5 – 9, primerconcentratie set 3 met 10x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol; laan 10 – 14, primerconcentratie set 3 met 100x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol; laan 15 – 19, primerconcentratie set 4 met 10x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol; laan 20, primerconcentratie set 4 met 100x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol. **Middelste gel**; laan 2 – 5, primerconcentratie set 4 met 100x verdund DNA aangelengd in 50% glycerol. **Onderste gel**; niet bij het experiment horende stalen.



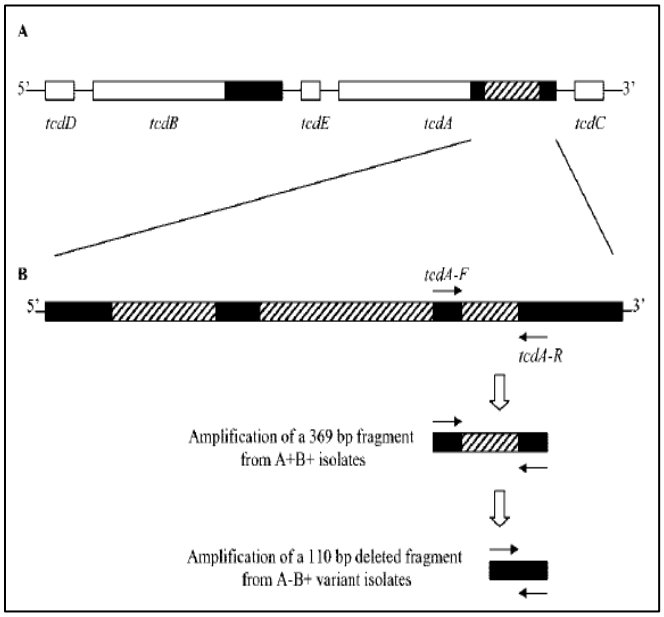
Figuur 7.4 Aanwezigheid van toxine A en toxine B genen. Van 26 *C. difficile* stammen werden de toxinegenen bepaald m.b.v. amplificatie met tcdA en tcdB primers (A, B, C, D). Tevens werd de aanwezigheid van het huishoudgen *tpi* bepaald. **Bovenste gel**; 1e laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 15, *C. difficile* ribotypes BR001, BR002, BR003, BR012, BR014, BR015, BR017, BR020, BR023, BR027, BR029, BR046, BR053, BR056. **Onderste gel**; 1e laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 14, *C. difficile* ribotypes, BR070, BR075, BR078, BR081, BR087, BR095, BR106, BR126, BR131, CDVPI, CD1067, CD1165, negatieve controle.



Figuur 7.5 Aanwezigheid van binaire toxinegenen. Van 26 *C. difficile* stammen werden de toxinegenen bepaald m.b.v. amplificatie met cdtA en cdtB primers **A, B, D) Bovenste gel**; 1e laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 20, *C. difficile* ribotypes BR001, BR002, BR003, BR012, BR014, BR015, BR017, BR020, BR023, BR027, BR029, BR046, BR053, BR056, BR070, BR075, BR078, BR081, BR087. **Onderste gel**; 1e laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 9, *C. difficile* ribotypes BR095, BR106, BR126, BR131, CDVPI, CD1067, CD1165, negatieve controle; laan 10 – 20, niet bij het experiment horend stalen. **C) Bovenste gel**; 1e laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 15, *C. difficile* ribotypes BR001, BR002, BR003, BR012, BR014, BR015, BR017, BR020, BR023, BR027, BR029, BR046, BR053, BR056. **Onderste gel**; 1e laan, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, 100 – 3000 bp); laan 2 – 14, *C. difficile* ribotypes, BR070, BR075, BR078, BR081, BR087, BR095, BR106, BR126, BR131, CDVPI, CD1067, CD1165, negatieve controle; laan15, niet bij het experiment horend staal.



Figuur 7.6 Opstelling NRU assay. De buitenste wells bevatten geen Caco-2 cellen. Tweede kolom, incubatie met caco-2 celmedium; voorlaatste kolom, incubatie met TSB medium. In oranje kader: eerste, tweede en derde rij, incubatie met afnemende concentratie van BA ZP; vierde en vijfde rij, incubatie met afnemende concentratie van BA SN; zesde rij, incubatie met afnemende concentratie van de positieve controle SDS.



Figuur 7.7 Positie van voorwaartse en achterwaartse tcdA primers laten een differentiatie toe tussen A^+B^+ en A^-B^+ stammen. (A) Het pathogene locus met toxinegenen *tcdA* en *tcdB*; en omliggende genen *tcdD*, *tcdE* en *tcdC*. Zwarte gebieden zijn 3' gelegen repetitieve sequenties karakteristiek voor *C. difficile tcdA* en *tcdB* genen; het gearceerde gebied is een 1,8-kb deletie aanwezig in de meeste A-B+ stammen. (B) Detail van de 1,8-kb deletie, dat drie kleine deleties omvat (gearceerde regio). De tcdA primers flankeren de kleinste deletieregio aan 3' einde van *tcdA* en genereren zo een 369-bp lang fragment bij A^+B^+ stammen en een 110-bp lang fragment bij A^-B^+ stammen (Lemee et al., 2004).